

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Física Aplicada



**Biofuncionalización de superficies de silicio
monocristalino, nanoestructurado y macroporoso.**

Memoria presentada por: María Arroyo Hernández

Para optar al grado de Doctor

Madrid, noviembre de 2006.

A mi Familia

Agradecimientos:

Quiero dar las gracias a todas las personas que han colaborado en la realización de esta Tesis, tanto desde el punto de vista científico como del personal:

Al profesor José Manuel Martínez Duart, por haber confiado en mi trabajo, haberme acogido en su grupo de investigación y haberme formado a lo largo de todos estos años. Al doctor Miguel Manso por sus acertadas observaciones y discusiones.

Al doctor José Pérez Rigueiro de la ETSI Caminos, Canales y Puertos de la Universidad Politécnica de Madrid, cuya herencia en el Departamento de Física Aplicada abrió el camino para realizar este trabajo. Por estar siempre disponible y, sobre todo, por su gran optimismo.

A la doctora Josefa Predestinación y a Carmen Ruiz Navas del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, cuyos conocimientos y medios han permitido el desarrollo de los trabajos biológicos.

A todo el personal científico que ha colaborado tanto en la elaboración de las medidas como en la discusión científica que se ha generado a partir de ellas: a la doctora Ana Conde del Campo, del Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas (CENIM), por las medidas de XPS de las películas depositadas por TACVD; al doctor Luis Vázquez del Instituto de Ciencias de Materiales de Madrid por la realización de las medidas de AFM; a los doctores Vicente Torres Costa y Raúl Martín Palma, del Departamento de Física Aplicada, por la fabricación de las multicapas de silicio poroso. Al doctor Aurelio Climent Font, del Departamento de Física Aplicada y Director del Centro de Microanálisis de Materiales, y a los doctores Raúl Gago y Ángel Muñoz por las medidas de RBS y ERDA. Al doctor Giacomo Ceccone del Institut for Health and Consumer Protection (Ispra-Italia) por los análisis de XPS de las películas obtenidas por inmersión.

Al personal técnico, por la maestría con que han desarrollado su trabajo: a Graciano Hueso, del Departamento de Física Aplicada, por llevar a la práctica cuantas modificaciones sobre papel se nos han ocurrido a lo largo de estos años. A Pascual Torres Redondo, Esperanza Salvador y Marta Furió del Servicio

Interdepartamental de Investigación (SIDI-UAM), a Carlos Sánchez y M^a Ángeles Muñoz del servicio de Microscopía Óptica y Confocal del Centro de Biología Molecular por combinar trabajo y simpatía a partes iguales.

A mis compañeros del grupo: Vicente, Miguel, Elena López, Raúl, Elena Santiago, Manuel.... por todo lo que hemos compartido a lo largo de estos años. A mis compañeros del Departamento de Física Aplicada.

Y, por supuesto, a Dani, a mi familia y a mis amigos porque no sólo a base de Ciencia se hecho esta Tesis.

*“Dímelo y lo olvidaré,
muéstramelo y lo recordaré,
involúcrame y lo entenderé”.*
Confucio.

*“No pongáis en duda que un pequeño grupo de personas comprometidas
y consideradas puede cambiar el mundo. De hecho, es el único
motor que siempre lo consigue”.*
Margaret Mead.

Índice

Capítulo 1: Introducción.

1.1. Introducción.....	3
1.2. Objetivos de la Tesis.....	8
1.3. Estructura de la memoria de Tesis.....	9
1.4. Bibliografía.....	10

Capítulo 2: Técnicas experimentales.

2.1. Introducción.....	15
2.2. Técnicas de biofuncionalización.....	16
2.2.1. Inmersión en disoluciones de APTS en tolueno.....	16
2.2.2. Deposición química en fase vapor activada por plasma.....	17
2.2.3. Deposición química en fase vapor activada térmicamente.....	18
2.3. Preparación de sustratos de silicio nanoestructurado y macroporoso.....	21
2.4. Técnicas de caracterización.....	23
2.4.1. Microscopía electrónica de barrido.....	23
2.4.2. Microscopio de fuerzas atómicas.....	24
2.4.3. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier.....	24
2.4.4. Espectroscopía de retrodispersión de Rutherford y análisis de retroceso elástico.....	26
2.4.5. Espectroscopía de fotoemisión de rayos X.....	28
2.4.6. Microscopía de fluorescencia y confocal.....	30
2.4.7. Absorbancia en el ultravioleta.....	32
2.4.8. Interacción sustrato-estructura biofuncional.....	33
2.5. Bioactividad y ensayos biológicos.....	34
2.5.1. Bioactividad.....	35
2.5.2. Inmovilización de proteínas.....	36
2.5.3. Inmovilización de ADN.....	37
2.5.4. Respuesta celular a las superficies de los sustratos.....	38
2.5.6. Crecimiento de hongos.....	39
2.6. Bibliografía.....	40

Capítulo 3: Preparación y caracterización de los sustratos de silicio poroso.

3.1. Introducción	45
3.2. Propiedades de los sustratos de silicio poroso recién formado.....	45
3.2.1. Caracterización morfológica.....	46
3.2.2. Caracterización química	48
3.2.3. Fotoluminiscencia	52
3.3. Influencia de los tratamientos de preparación para los ensayos biológicos	52
3.3.1. Composición química	53
3.3.2. Fotoluminiscencia	58
3.4. Sumario	63
3.5. Bibliografía	65

Capítulo 4: Biofuncionalización por inmersión.

4.1. Introducción	69
4.2. Caracterización morfológica.....	70
4.3. Caracterización química	77
4.3.1. Análisis de FTIR	77
4.3.2. Análisis de XPS	83
4.4. Interacción sustrato-estructura biofuncional.....	91
4.5. Reactividad superficial	93
4.5.1. Análisis de fluorescencia	94
4.5.2. Absorbancia en el ultravioleta	95
4.6. Sumario	98
4.7. Bibliografía	100

Capítulo 5: Biofuncionalización por deposición química en fase vapor (CVD).

5.1. Introducción	103
5.2. Estudios preliminares: biofuncionalización por PECVD	104
5.3. Biofuncionalización por TACVD	110
5.3.1. Análisis morfológico.....	111
5.3.1.2. Propiedades de las capas obtenidas en condiciones de referencia (CR)	112
5.3.1.2. Influencia de los parámetros de funcionalización.....	115
5.3.1.3. Estructuras especiales: laberintos y estrías	123

5.3.2. Análisis de microdureza.....	126
5.3.3. Análisis de la composición química	129
5.3.3.1. RBS y ERDA	129
5.3.3.2. Análisis de FTIR.....	132
5.3.3.3. Análisis de XPS	147
5.3.4. Reactividad superficial	161
5.3.4.1. Análisis de fluorescencia	161
5.3.4.2. Absorbancia en el ultravioleta	169
5.3.5. Influencia de los sustratos.....	174
5.4. Sumario	176
5.5. Bibliografía	178

Capítulo 6: Bioactividad y ensayos biológicos.

6.1. Introducción	183
6.2. Ensayos de bioactividad.....	183
6.3. Inmovilización de proteínas.....	190
6.4. Inmovilización de ADN.....	198
6.5. Respuesta celular a las superficies de los sustratos	203
6.6. Crecimiento de hongos	207
6.7. Sumario	211
6.8. Bibliografía	212

Capítulo 7: Conclusiones.

7.1. Introducción	217
7.2. Resumen de resultados.....	217
6.3. Conclusiones	221
6.4. Líneas futuras de investigación.....	223

Capítulo 1

Introducción.

1.1. Introducción.

A lo largo de las últimas décadas, la combinación de áreas de la Física, tales como la física de superficies, catálisis o microelectrónica y la Biología, en particular la Biología Molecular, ha dado lugar al desarrollo de campos de investigación interdisciplinarios, englobados dentro del área de la Biofísica [1, 2]. Algunas de las aplicaciones más relevantes surgidas de estas investigaciones son los biosensores [3, 4], las prótesis [5, 6] o la aplicación localizada de fármacos en el cuerpo humano [7, 8]. La característica principal de todas las aplicaciones anteriores es la importancia de la interacción entre la superficie de los materiales y los diversos sistemas biológicos, considerando que éstos comprenden desde moléculas tan sencillas como las moléculas de agua, presentes en todos los fluidos orgánicos y constituyentes fundamentales de los seres vivos, hasta organismos pluricelulares. Por tanto, el desarrollo de interfases material/sistema biológico estables es uno de los puntos de investigación fundamentales para el desarrollo y el perfeccionamiento de la mayor parte de aplicaciones de la Biofísica. Este desarrollo de interfases estables requiere, en general, que se modifique la composición química superficial de los materiales.

La modificación de la composición química superficial de los materiales mediante la fijación de grupos funcionales recibe el nombre de funcionalización. En particular, se llama **biofuncionalización** al proceso por el cual se fijan cadenas orgánicas que contienen grupos funcionales tales como los carboxilo ($-\text{COOH}$), los tioles ($-\text{SH}$) o los amino ($-\text{NH}_2$), que pueden formar enlaces covalentes con diversas biomoléculas bajo condiciones fisiológicas, permitiendo de esta manera la interacción estable entre los materiales y los sistemas biológicos. Algunos ejemplos de los tipos de funcionalización más empleados se basan en la formación de monocapas autoensambladas (SAM's), en la hidrosilización o la silanización. Uno de los ejemplos más comunes de la formación de SAM's es la fijación de grupos tioles sobre superficies de oro y óxido de silicio [9, 10]. La hidrosilización se realiza mediante la reacción de precursores que contienen grupos alquenos ($\text{C}=\text{C}$) o alquinos ($\text{C}\equiv\text{C}$) con superficies ricas en estructuras Si-H , formando enlaces Si-C mediante diversos métodos de activación de la reacción, como luz ultravioleta o ácidos de Lewis [11, 12, 13]. Por último, la silanización consiste en la reacción química entre organosilanos funcionales

(*silane coupling agents*) y grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) superficiales que actúan como sitios de enlace en superficies de silicio o de vidrio, mediante la formación de estructuras tipo siloxano (Si-O-Si) [14, 15, 16]. Como se desprende de los ejemplos de funcionalización anteriores, la característica fundamental de todas estas técnicas es la correspondencia tan estrecha que existe entre precursores y superficies, de manera que para funcionalizar superficies con unas propiedades químicas determinadas, se requiere una familia de precursores específica. En particular, para superficies ricas en grupos $-\text{OH}$, los precursores necesarios son organosilanos funcionales y viceversa, los organosilanos funcionales enlazan mediante estructuras siloxano con superficies ricas en grupos $-\text{OH}$.

Entre los organosilanos más empleados en silanización, se encuentra el 3-aminopropiltrietoxisilano (APTS: $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$) que pertenece en concreto a la familia de los alcoxisilanos. En la figura 1.1 se muestra la configuración espacial de esta molécula que consta de un átomo central de Si unido a tres cadenas etoxi ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$; $-\text{O}-\text{Et}$) y a una cadena aminopropil ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$).

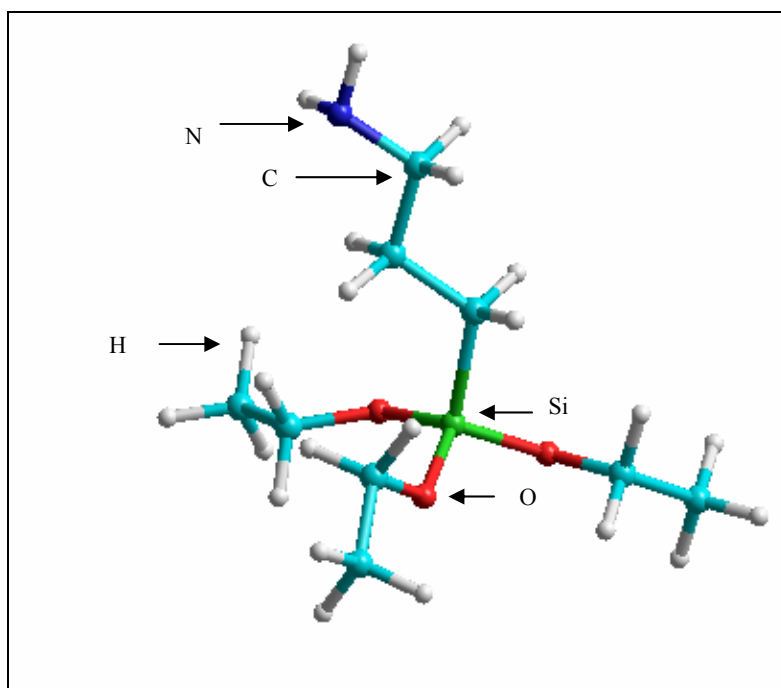


Figura 1.1: Estructura tridimensional del APTS. Los átomos blancos corresponden a H, los azul claro a C, el rojo a Si y el azul a N.

El APTS es uno de los metalorgánicos más extensamente empleados y caracterizados [17, 18, 19] debido, entre otras razones, a que se trata de una molécula bifuncional, esto es que contiene dos grupos funcionales distintos: el grupo amino

(NH₂) y las tres cadenas etoxi (-O-Et). Las moléculas de APTS son altamente hidrolizables en presencia de agua, sustituyendo las cadenas etoxi por grupos -OH como consecuencia de dicha hidrólisis. Mediante estos grupos -OH, las moléculas de APTS pueden reaccionar tanto con los grupos -OH de la superficies de un sustrato (condensación sobre la superficie) como con los grupos -OH de otra moléculas de APTS hidrolizada, dando lugar a la formación de oligómeros (policondensación de APTS). En ambos casos, la reacción se produce mediante la formación de estructuras siloxano (Si-O-Si) y la liberación de moléculas de agua. El grupo amino por su parte tiene una doble funcionalidad, pues por un lado actúa como catalizador de la condensación del APTS sobre las superficies y de la policondensación de las moléculas de APTS entre sí, mediante la formación de enlaces por puente de hidrógeno con silanoles [20] y, por otro lado, permite la inmovilización de una gran variedad de biomoléculas. Así, mediante la formación de enlaces peptídicos, los grupos amino pueden reaccionar con todas aquellas moléculas que contengan grupos carboxilo (-COOH). Mediante el empleo de agentes entrecruzantes (*cross-linkers*), se puede cambiar la terminación superficial a otros grupos funcionales tales como los carboxilo o los tioles (-SH) e incluso mediante la exposición de los grupos amino a la radiación UV se pueden transformar en grupos (-OH) [21]. Este último mecanismo de activación, permite la fijación por enlace covalente de ácidos nucleicos [22]. Por todo ello, mediante el empleo de APTS se pueden inmovilizar sobre las superficies los dos tipos de biomoléculas más importantes respecto a su funcionalidad biológica: las proteínas (enzimas, anticuerpos, etc.) y los ácidos nucleicos (ADN y ARN).

La **silanización empleando APTS** como precursor se realiza mediante métodos en disolución y métodos en fase gaseosa. En el primer caso, los sustratos se sumergen en disoluciones de APTS y disolventes orgánicos [17, 21, 23], siendo el tolueno uno de los más empleados. El **proceso de inmersión** da lugar a la formación de una monocapa de oligómeros de APTS sobre la que se depositan estructuras coloidales, formadas como consecuencia de la policondensación y de las interacciones mediante puentes de hidrógeno de los grupos amino con otros grupos amino y con silanoles (tanto superficiales como de otras moléculas de APTS hidrolizadas). El método de inmersión tiene la ventaja de la sencillez y rapidez en la realización, además de la gran cantidad de información existente, ya que su uso con APTS está muy extendido. Sin embargo, presenta como inconvenientes principales la falta de reproducibilidad y la formación de

depósitos poco uniformes, debido a la sensibilidad del proceso respecto a las condiciones de la reacción: temperatura de la disolución, concentración del silano, tiempo de inmersión, tipo de disolvente, etc, y al elevado número de fenómenos que intervienen en el proceso: interacción entre los grupos amino y los silanoles de la superficie, hidrólisis, reacciones de policondensación, etc.

Los métodos de funcionalización con APTS en **fase vapor**, no requieren la presencia de disolventes orgánicos y se basan en la deshidratación de las superficies de los sustratos. Para llevarlos a cabo, los sustratos se calientan en vacío, el APTS se evapora y la reacción tiene lugar sobre la superficie del sustrato, cuya temperatura se fija alrededor de 100°C. De esta forma, se consigue un mejor control sobre los procesos de hidrólisis y polimerización [24, 25], que da como resultado la reducción de las estructuras coloidales que se forman en los métodos de inmersión y una mejora significativa de la reproducibilidad. No obstante, es importante destacar que, aunque los métodos en fase vapor basados en la deshidratación del sustrato superan algunos de los inconvenientes asociados a los métodos en disolución, siguen teniendo la limitación de requerir la presencia previa de grupos –OH sobre las superficies.

Uno de los **sustratos** más empleado en los métodos de silanización con APTS es el **silicio**. El silicio es el segundo elemento en abundancia en la corteza terrestre, presente en forma de óxido (SiO₂) y silicatos, esencialmente. El silicio cristaliza con estructura cúbica centrada en las caras y es un semiconductor de gap indirecto con un valor de 1.2 eV. Las aplicaciones más relevantes del silicio corresponden al área de la microelectrónica debido a la facilidad con que se puede modificar su conductividad mediante el dopaje controlado y a las buenas propiedades aislantes que presentan las capas de óxido que pasivan su superficie y que constituyen una de las más eficientes interfases semiconductor/aislante. Otras propiedades como su baja rugosidad superficial y su transparencia en el infrarrojo, hacen del silicio un sustrato óptimo para el empleo de técnicas de caracterización como la microscopía de fuerzas atómicas o las espectroscopías en el infrarrojo. En cuanto a las aplicaciones biológicas, el silicio ha sido muy estudiado en la fabricación de biosensores cuya aplicación sólo se realiza *in-vitro* [26], debido a su baja compatibilidad con sistemas biológicos realizados *in-vivo*.

A partir del silicio se puede obtener, de forma rápida y sencilla, un material de estructura porosa con propiedades significativamente diferentes al silicio, el **silicio poroso**, que fue descubierto en los años 50 en los laboratorios de la Bell. Sin embargo,

el auge en la investigación sobre este material no se produjo hasta que en el año 1990 Canham descubrió su intensa fotoluminiscencia en el rango visible [27], con eficiencia muy superior al resto de materiales basados en silicio. A partir de ese momento, el elevado número de investigaciones basadas en silicio poroso mostraron otras muchas propiedades de gran interés, tanto para aplicaciones opto-electrónicas [28, 29] como para aplicaciones biomédicas [30, 31, 32].

El silicio poroso es un material poroso de morfologías muy diversas [33, 34], constituido por una matriz de silicio parcialmente amorfo. En el caso particular del silicio poroso nanoestructurado, en dicha matriz quedan embebidos cristales de silicio de tamaño nanométrico, responsables en buena medida de su intensa fotoluminiscencia. Desde el punto de vista del empleo del silicio poroso en aplicaciones biofísicas, se pueden destacar varias propiedades de interés. La elevada superficie específica que presenta aumenta significativamente el área disponible para la interacción con moléculas orgánicas y sistemas biológicos. Además, se trata de un material biocompatible, cuyo comportamiento se puede variar, pasando de un material bioinerte a bioactivo o a reabsorbible [35, 36, 37]. Estas propiedades dependen de la porosidad y del tamaño de poro, que se pueden controlar con precisión a partir de las condiciones de fabricación [38, 39]. Por otra parte, sus propiedades ópticas y eléctricas, junto con la implementación directa en la microelectrónica basada en el silicio, hacen del silicio poroso un material idóneo para la aplicación en el área de los biosensores [40]. Todo ello hace que el silicio poroso sea un material cada vez más empleado en aplicaciones derivadas de la Biofísica, especialmente en el desarrollo de biosensores o en la aplicación localizada de fármacos, escogiendo los parámetros de formación que dan lugar a la porosidad y el tamaño de poro adecuados a cada tipo de aplicación.

Sin embargo, el silicio poroso presenta una elevada reactividad superficial, de manera que la composición química superficial del silicio poroso recién formado está compuesta mayoritariamente por estructuras SiH_x ($x = 1-3$) [41] y transcurridos unos segundos, empieza a incorporarse oxígeno a la superficie, en forma de enlaces Si-O-Si y de estructuras del tipo $\text{O}_x\text{-Si-H}$ ($x = 1-3$) [42, 43, 44]. Este hecho representa un inconveniente para el empleo del silicio poroso en aplicaciones que requieran previamente su funcionalización, debido a la estrecha correspondencia existente entre precursores y química superficial de los sustratos.

1.2 Objetivos de la Tesis.

El objetivo fundamental de este trabajo de Tesis es la biofuncionalización de superficies de silicio monocristalino, nanoestructurado y macroporoso. Estos tres tipos de sustratos se han elegido por las interesantes y diversas propiedades que presentan de cara a su empleo en distintas aplicaciones derivadas del desarrollo de la Biofísica. Así, el **silicio monocristalino** presenta un comportamiento bioinerte. El silicio poroso a su vez permite introducir un amplio rango de morfologías y propiedades optoelectrónicas y de biocompatibilidad, que se pueden seleccionar con precisión a partir de las condiciones de fabricación. En particular, el **silicio nanoestructurado** está formado por poros de tamaño nanométrico, es fotoluminiscente, y presenta propiedades ópticas, tales como el índice de refracción o la propia fotoluminiscencia, que se pueden controlar con precisión a partir de los parámetros de fabricación. Además, el silicio nanoestructurado con poros en el rango entre 10 y 50 nm presenta un comportamiento bioactivo. Este conjunto de propiedades hace del silicio nanoestructurado un sustrato óptimo para el desarrollo de biosensores. Por su parte, el **silicio macroporoso** está formado por poros del tamaño de una micra que le confieren un comportamiento reabsorbable. Este tamaño de micras es del orden del asociado a sistemas biológicos más complejos, por ejemplo las células, por lo que permite introducir nuevas variables de estudio como la vascularización de dichos sistemas. Estas propiedades hacen del silicio macroporoso un sustrato adecuado para su empleo en la aplicación localizada de fármacos o en el desarrollo de la ingeniería de tejidos. Sin embargo, el silicio poroso presenta una elevada reactividad superficial, lo que supone una cierta limitación para su biofuncionalización, debido a que la mayor parte de las técnicas son muy dependientes del estado químico del sustrato. Por todo lo anterior, el cumplimiento del objetivo de esta Tesis hace necesario desarrollar un método de biofuncionalización que no requiera unas propiedades químicas específicas del sustrato, de manera que pueda aplicarse a un amplio rango de materiales y, en particular a materiales como el silicio poroso, nuestro material de interés, que presenta una composición química superficial variable con el tiempo. Para ello, se han desarrollado y estudiado métodos en fase vapor basados en la activación del APTS por plasma y la activación térmica, a diferencia de los métodos en fase vapor utilizados tradicionalmente con APTS, que se basan en la evaporación del precursor y la deshidratación del sustrato. Para la activación térmica se ha diseñado y

fabricado un reactor, basado en los reactores estándar de deposición química en fase vapor, en el que se han introducido determinadas modificaciones que permitan el cumplimiento de los objetivos de la Tesis.

Por lo tanto, este trabajo de Tesis se enmarca dentro del área interdisciplinar de la Biofísica, al combinar el estudio y caracterización de materiales y técnicas de deposición de lámina delgada, desde el punto de vista de sus propiedades físico-químicas, con los estudios de interacción entre estos materiales y diversos sistemas biológicos, desde biomoléculas hasta organismos pluricelulares.

1.3. Estructura de la Memoria de Tesis.

Los resultados presentados en esta memoria de Tesis están estructurados en tres grandes bloques: preparación y caracterización de los sustratos empleados, desarrollo de técnicas de funcionalización aplicables a sustratos con composición química superficial variable en el tiempo y, por último, evaluación de las propiedades de interacción con sistemas biológicos de diversa complejidad.

En el capítulo 2 se recogen todas las técnicas experimentales empleadas a lo largo de este trabajo. En primer lugar, se describen las técnicas de funcionalización estudiadas: el método de inmersión en disoluciones de APTS y los métodos en fase vapor desarrollados en este trabajo. A continuación, se hace un breve resumen de las técnicas de caracterización empleadas para estudiar las propiedades de los sustratos de partida y de las películas funcionales obtenidas a partir de los diversos procesos de funcionalización. Por último, se describen los ensayos biológicos realizados para evaluar las propiedades de biocompatibilidad y de interacción de las muestras con diversos sistemas biológicos.

En el capítulo 3 se realiza la caracterización físico-química de los sustratos de silicio poroso empleados y se estudia la influencia que tienen los tratamientos previos a su empleo en los diversos ensayos biológicos.

En el capítulo 4 se estudian las propiedades más relevantes de las láminas funcionales obtenidas mediante el proceso de inmersión. Estos resultados sirven como referencia para evaluar las propiedades de las láminas resultantes de los métodos de funcionalización estudiados y desarrollados en esta Tesis.

En el capítulo 5 se muestran los resultados de las técnicas de funcionalización por deposición química en fase vapor, y que constituyen la parte más novedosa de esta Tesis al estudiar el desarrollo de técnicas de funcionalización independientes de la composición química de los sustratos. La caracterización de las películas resultantes se realiza respecto a las propiedades físico-químicas y la influencia de los parámetros que controlan el proceso sobre dichas propiedades. Entre las propiedades de interés destacan la morfología, la composición química, tanto en volumen como en superficie, y la reactividad superficial.

Finalmente, en el capítulo 6 se analizan las propiedades de bioactividad, tanto de los sustratos como de las muestras obtenidas mediante las diversas técnicas de funcionalización de los mismos. Además, se estudia el comportamiento y las propiedades de los materiales al interaccionar con diversos sistemas biológicos, como proteínas, ADN y hongos. Por último, en este capítulo se perfila una primera aproximación a futuras aplicaciones de los recubrimientos funcionales obtenidos, en relación a los diversos sistemas biológicos.

1.4. Bibliografía:

1. B. Kasemo, Surface Science 500 (2002) 656-677.
2. D.G. Castner, B.D. Ratner, Surface Science 500 (2002) 28-60.
3. J. Wang. Nucleic Acids Research 28 (2000) 16, 3011-3016.
4. R.S. Sethi. Biosensors & Bioelectronics 9 (1994) 3, 243-264.
5. J.Charnley. Journal of Bone and Joint Surgery-British 42 (1960) 1, 28-30.
6. A. Curtis, C. Wilkinson. Biomaterials 18 (1997) 24, 1573-1583.
7. S. Schacht, Q. Huo, I.G. VoigtMartin, G.D. Stucky, F. Schuth. Science 273 (1996) 5276, 768-771.
8. A. Gopferich. Biomaterials 17 (1996) 2, 103-114.
9. K.L. Prime , G.M. Whitesides. Science 252 (1991) 5009,1164-1167.
10. R.P. Andres, J.D. Bielefeld, J.I. Henderson, D.B. Janes, V.R. Kolagunta, C.P. Kubiak, W.J. Mahoney, R.G. Osifchin. Science 273 (1996) 5282, 1690-1693.
11. J.M. Buriak. Chemical Communications 1999 (1999), 1051-1060.

12. M.P. Stewart, E.G.Robins, T.W.Geders, M.J.Allen, H.C. Choi, J.M.Buriak. *Physica Status Solidi (a)* 182 (2000), 109-115.
13. T. Kuhnen, R. Ruffolo, M. Stradioto, D.Ulbrich, M.J. McGlinchey, M.A. Brook. *Organometallics* 16 (1997) 5042-5047.
14. J.B.Brzoska, I.Benazouz, F.Rondelez. *Langmuir* 10 (1994) 11, 4367-4373.
15. A.Y.Fadeev, T.J.McCarthy. *Langmuir* 15 (1999) 11, 3759-3766.
16. D.G. Kurth, T. Bein. *Langmuir* 9 (1993), 2965-2973.
17. T. Ogasawara, A. Nara, H. Okabayashi, E. Nishio, C.J. O'Connor. *Colloid polymer science* 278 (2000) 1070-1084.
18. U. Schubert, N. Husing, A. Lorenz. *Chemistry of Materials* 7 (1995) 11, 2010-2027.
19. E.T. Vandenberg, L. Bertilsson, B. Liedberg, K. Uvdal, R. Erlandsson, H. Elwing, I. Lundstrom. *Journal of Colloid and Interface Science* 147 (1991) 1, 103-118.
20. P. Trens, R. Denoyel. *Langmuir* 12 (1996), 2781-2784.
21. P.X. Zhu, Y. Masuda, K.Koumoto. *Journal of Colloid and Interface Science* 243 (2001) 31-36.
22. *Current Protocols in Molecular Biology*. (2004), Sección IV, 2.9.1-2.9.20. Ed. John Wiley & Sons, Inc.
23. D.G. Kurth, T. Bein. *Langmuir* 11 (1995), 3061-3067.
24. I. Haller. *Journal of the American Chemical Society* 100 (1978), 8050-8055.
25. P. Wilkstrom, C.F.Mandenius, P.O.Larsson. *Journal of Chromatography* 455 (1988), 105-117.
26. B.W. Kristensen, J. Noraberg, P. Thiébaud, M. Koudelka-Hep, J. Zimmer. *Brain research* 898 (2001), 1-17.
27. L.T. Canham, *Applied Physics Letters*, 57 (1990), 1946.
28. V. Torres-Costa, F. Agulló-Rueda, R.J. Martín-Palma, J.M. Martínez-Duart. *Optical Materials*, 27 (5), 1084-1087 (2004)
29. V. Torres-Costa, R.J. Martín-Palma, J.M. Martínez-Duart. *Materials Science and Engineering C* (en prensa)
30. M. Thust, M.J. Schoning, S. Frohnhoff, R. ArensFischer, P. Kordos, H. Luth. *Measurement Science & Technology* 7 (1996) 1, 26-29.
31. S. Chan, Y. Li, L.J. Rothberg, B.L. Millar, P.M. Fauchet. *Materials Science and Engineering C* 15 (2001) 277-282;
32. M.P. Stewart, J.M.Buriak, *Advanced Materials* 12 (2000) 2, 859-869

33. R.L. Smith, S.D. Collins, *Journal of Applied Physics (USA)*, 138 (1992), pR1.
34. P.C. Searson, *Advances in electrochemical sciences and Engineering*, Manheim 1994, ch.2, p 69.
35. L.T. Canham, C.L. Reeves, A. Loni, M.R. Houlton, J.P. Newey, A.J. Simons, T.I. Cox. *Thin Solid Films*, 297 (1997), 304-307.
36. L.T. Canham, C.L. Reeves, J.P. Newey, M.R.Houlton, T.I. Cox, J. M. Buriak, M. P. Stewart. *Advance Materials*, 11 (1999), 18, 1505-1507.
37. S.H.C. Anderson, H. Elliot, D.J. Wallis, L.T. Canham, J.J. Powell. *Physics Status Solidi (a)*, 197 (2003), 2, 331-335.
38. M.J. Schöning, A. Kurowski, M. Thust, P. Kordos, J.W. Schultze, H. Lüth. *Sensors and Actuators B* 64 (2000) 59-64.
39. J.M. Martinez-Duart, V.P. Parkhutik, R. Guerrero, D. Moreno, *Advanced Materials* 7 (1995), 226-228
40. J.L. Coffey, J. Montchamp, J.B. Aimore, R.P. Weiss. *Physics Statu Silidi (a)*, 197 (2003), 2, 336-339.
41. A. Venkateswara, F. Ozanam, J.N. Chazalviel. *Journal of Electrochemistry Society* 138 (1991), 153.
42. Y. Kato, T. Ito, A. Hiraki. *Journal of Applied Physics (Japan)* 27 (1998), L1406.
43. C.H. Lin, S.C. Lee, Y.F. Chen. *Journal of Applied Physics (USA)* 75 (1994) 12, 7728.
44. S.H. Choi, G.W. Lee. *Supperlattices Microstructures (UK)* 20 (1996) 207.

Capítulo 2

Técnicas experimentales.

2.1 Introducción.

A lo largo de este capítulo se describe el conjunto de las técnicas experimentales empleadas para la realización de esta Tesis: las técnicas de biofuncionalización, la preparación de sustratos, las técnicas de caracterización y los ensayos realizados para evaluar la bioactividad y la interacción de los sustratos y de las películas biofuncionales con diversos sistemas biológicos.

En el apartado 2.2 se explican las distintas técnicas de biofuncionalización empleadas a lo largo de este trabajo: la técnica de inmersión en disoluciones de 3-aminopropiltrietoxisilano (APTS) y tolueno y las técnicas de deposición química en fase vapor (CVD), activando el precursor por plasma o térmicamente. La técnica de CVD por activación térmica, se explica con más detalle puesto que el reactor en que se realiza ha sido concebido y desarrollado en nuestro grupo de acuerdo a los objetivos expuestos en el capítulo 1.

En el apartado 2.3, se explica la formación de los sustratos de silicio poroso y los parámetros empleados para su fabricación ya que éstos determinan la porosidad y el tamaño de poro de los que dependen buena parte de sus propiedades.

En el apartado 2.4, se describen las técnicas de caracterización empleadas para evaluar las propiedades de los sustratos y de las películas biofuncionales obtenidas por las distintas técnicas. La caracterización se realiza respecto a propiedades físico-químicas, tales como el espesor, la homogeneidad, la topografía o la composición química y respecto a propiedades de reactividad superficial, que dependen de la concentración de grupos funcionales y de la accesibilidad de los mismos a las distintas biomoléculas.

Por último, en el apartado 2.5 se explican los ensayos realizados para caracterizar la bioactividad y evaluar las propiedades que los materiales presentan frente a la interacción con diversos sistemas biológicos. En cada caso, se hace una breve explicación de los pasos seguidos para la realización del ensayo, acompañada del protocolo correspondiente, que recoge los detalles específicos.

2.2. Técnicas de biofuncionalización

En este trabajo de Tesis se ha estudiado el desarrollo de técnicas de biofuncionalización basadas en la deposición química en fase vapor (CVD) [1, 2] que no requieran un estado químico particular de la superficie del sustrato, de forma que se puedan aplicar de forma sistemática tanto a materiales con una superficie muy reactiva, como es el caso del silicio poroso, como a superficies inertes, como el vidrio. Para evaluar los resultados obtenidos por estas técnicas, se ha tomado como referencia la funcionalización por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno, técnica estándar con APTS. Todas estas técnicas de funcionalización se basan en la fijación de grupos amino reactivos sobre la superficie a partir de un mismo precursor organometálico, el APTS.

2.2.1. Inmersión en disoluciones de APTS en tolueno.

El primero de los métodos de funcionalización estudiados consiste en la inmersión de los sustratos en disoluciones de APTS en tolueno. Como se explicó en el capítulo 1, este método se basa en la hidrólisis y condensación de las moléculas de APTS dando lugar a la formación de láminas delgadas y estructuras coloidales.

Esta técnica se ha estudiado sobre sustratos de silicio monocristalino, macroporoso y nanoestructurado. La preparación previa es diferente en cada caso. Los sustratos de silicio monocristalino se lavan secuencialmente en tricloroetileno, acetona y etanol durante 3 minutos con ultrasonidos y a continuación se sumergen en una disolución del 10 % de ácido fluorhídrico en agua desionizada, secándose posteriormente en atmósfera de nitrógeno. Los sustratos de silicio poroso se emplean tras ser secados en atmósfera de nitrógeno, inmediatamente después de su formación.

El proceso de funcionalización por inmersión se lleva a cabo en una cubeta de pirex, empleando disoluciones del 1% de APTS en tolueno. Para estudiar la influencia de la temperatura, el proceso se realiza a temperatura ambiente (23 °C) y calentando la disolución. En el primer caso, los sustratos se sumergen en una disolución que se mantiene a temperatura ambiente durante un tiempo comprendido entre 10 minutos y 7 horas. A continuación, los sustratos se lavan en tolueno y etanol sucesivamente. En el proceso realizado con aumento de temperatura de la disolución, los sustratos se sumergen en la disolución a temperatura ambiente durante un tiempo determinado, como en el caso

anterior, y transcurrido ese tiempo, la cubeta de pirex que contiene la disolución se sumerge en un baño de aceite de silicona calentado previamente a la temperatura seleccionada, entre 60 y 110°C. La disolución de APTS se calienta y se mantiene a dicha temperatura durante 5 minutos, tras los cuales, los sustratos se lavan como en el caso anterior. Estos lavados se realizan empleando ultrasonidos, solamente en el caso de los sustratos de silicio monocristalino. Finalmente, los sustratos ya funcionalizados se conservan en una cámara seca y en oscuridad hasta la evaluación de sus propiedades.

2.2.2. Deposición química en fase vapor activada por plasma: PECVD.

El PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition) es una técnica de deposición en la que la activación del precursor se realiza por medio de un plasma. Para su realización, se ha empleado un reactor CVD comercial, usado con anterioridad con otros precursores metalorgánicos como el tetraetoxisilano (TEOS) [3] y polímeros como la alilamina [4]. El empleo de este reactor con APTS ha requerido ciertas modificaciones. En particular, ha sido necesario desarrollar un sistema que permita la evaporación del APTS a temperatura ambiente y su transporte hasta la cámara de reacción, debido a la baja presión de vapor del APTS y su elevado peso molecular. Para conseguirlo, se fabricó una red de tubos capilares de celulosa (figura 2.1) que se introdujo en la cámara de reserva del precursor. A través de dicha cámara se hizo pasar un flujo de argón [5].

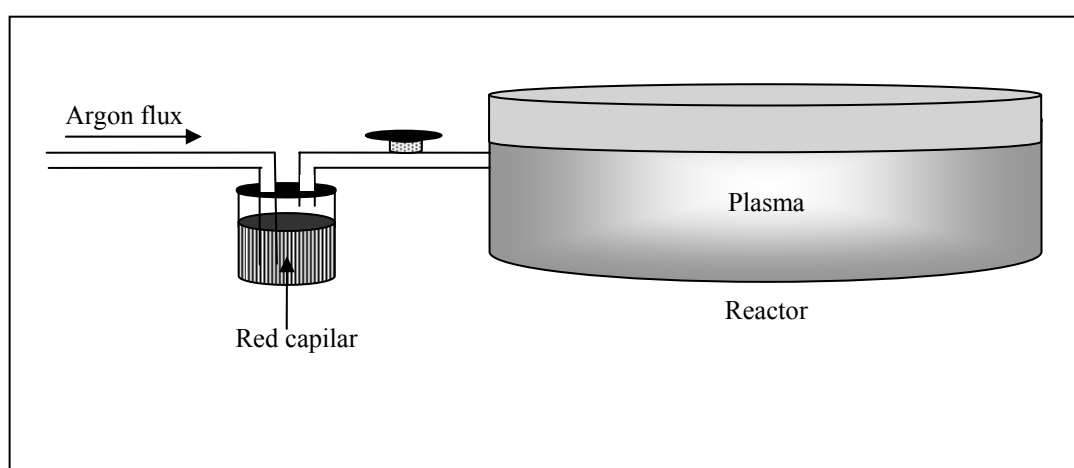


Figura 2.1: Esquema del reactor PECVD empleado, al que se ha acoplado un sistema de capilares para favorecer la evaporación del APTS a temperatura ambiente.

Los parámetros que controlan el proceso de deposición son: el flujo de argón de descarga del plasma (flujo de argón que se introduce directamente en la cámara de reacción

y se emplea para activar el plasma), la potencia del plasma, el flujo de argón de transporte (flujo que se hace pasar a través del sistema capilar para contribuir a la evaporación del APTS a temperatura ambiente) y el tiempo de deposición. El flujo de argón del plasma se ha mantenido como parámetro fijo con un valor de 100 sccm. La potencia de trabajo del plasma se ha variado entre 25-100 W, dejando en algunos casos un valor constante durante el proceso y en otros aumentándolo a intervalos regulares de 10 minutos. El flujo de argón de transporte se ha variado en el rango 0- 40 sccm. En todos los casos estudiados, el tiempo total de deposición ha sido de 30 minutos.

Antes de ser funcionalizados, los sustratos se enjuagaron en etanol y tras el proceso se guardaron en una cámara seca y en la oscuridad.

2.2.3. Deposición química en fase vapor activada térmicamente: TA-CVD.

El TACVD (Thermally Activated Chemical Vapor Deposition) es un método de deposición química en fase vapor en el que el precursor se activa térmicamente. El reactor en el que se realiza el proceso ha sido desarrollado y fabricado por nuestro grupo. Esto ha permitido introducir ciertas modificaciones respecto a un reactor CVD estándar con el objetivo de conseguir una técnica de biofuncionalización empleando APTS, que sea independiente del sustrato. El APTS se activa térmicamente, con el fin de que dicha activación permita la reacción con sustratos que presentan composiciones químicas diversas, en particular, sin presencia de grupos hidroxilo (-OH). Como el rango de temperaturas de activación necesarias en un CVD es de cientos de grados, lo que supone una nueva limitación respecto a los sustratos que se pueden emplear, entre las modificaciones realizadas se ha incluido la separación de los sustratos de la cámara de activación. De esta manera se logra que la temperatura que los sustratos alcanzan durante el proceso sea significativamente menor que la de activación y menor incluso que las temperaturas habituales en las técnicas de funcionalización en fase de vapor basadas en la evaporación del APTS y la deshidratación de los sustratos, que son típicamente de 100°C [6, 7].

Los sustratos empleados han sido silicio monocristalino, macroporoso y nanoestructurado fundamentalmente. De la misma manera que en la funcionalización por inmersión, el tratamiento de limpieza empleado para cada tipo de sustrato es diferente. Los sustratos de silicio monocristalino se lavan sucesivamente en tricloroetileno, acetona y

etanol durante 3 minutos en ultrasonidos. A continuación se sumergen en una disolución del 10 % de ácido fluorhídrico en agua desionizada y se secan en atmósfera de nitrógeno. Las muestras de silicio poroso se introducen en el reactor inmediatamente después de su formación y secado en atmósfera de nitrógeno.

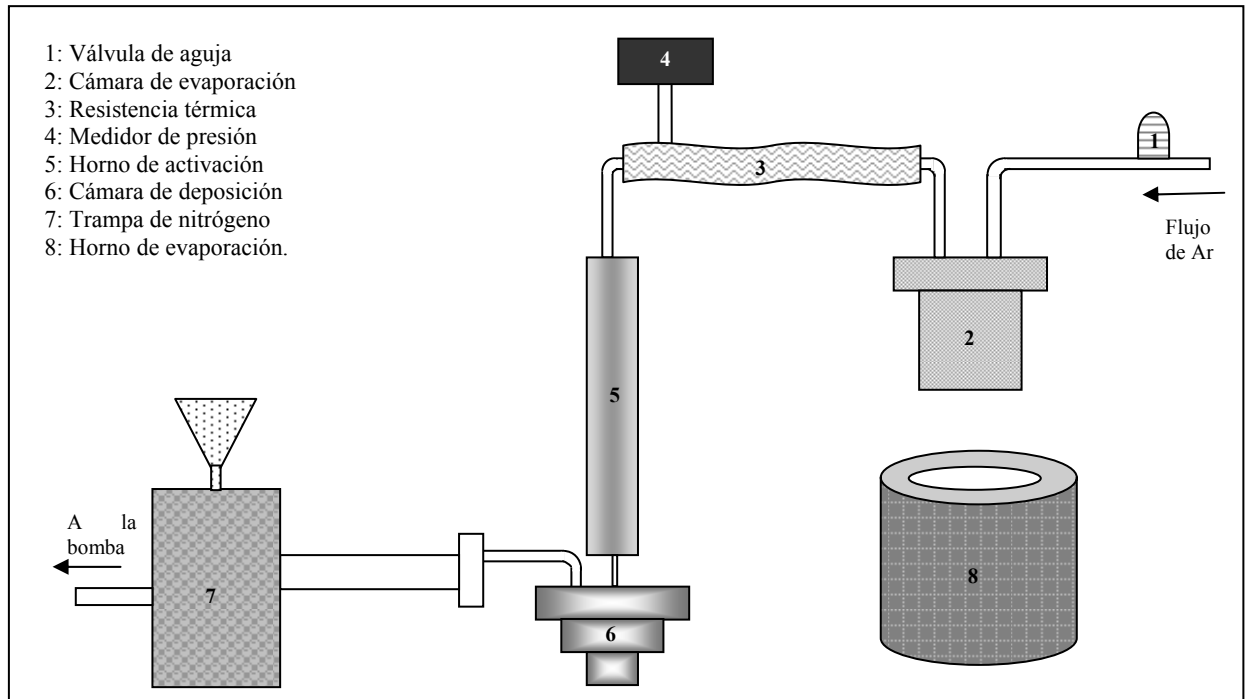


Figura 2.2: Esquema del reactor de TACVD.

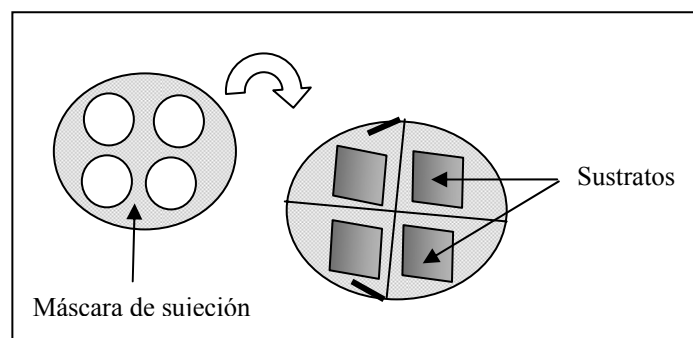


Figura 2.3: Sistema de montaje y sujeción de los sustratos en la cámara de deposición.

En la figura 2.2 se muestra un esquema del reactor TACVD. Este reactor consta de una cámara de evaporación (figura 2.2, 2), en la que se introduce un determinado volumen de APTS, 3 ml en general, en estado líquido. Esta cámara se calienta solamente durante el

proceso de funcionalización, mediante el horno de evaporación (figura 2.2, 8). Los sustratos que van a ser funcionalizados se sitúan en la cámara de deposición (figura 2.2, 6), que está situada a una distancia de 2 cm de la base del horno de activación (figura 2.2, 5), para conseguir de esta manera disminuir la temperatura que alcanzan durante el proceso. Los sustratos se colocan en la cámara de deposición, empleando un portamuestras como el de la figura 2.3, al que se sujetan mediante una máscara de aluminio para evitar que se desplacen durante el proceso. El proceso de biofuncionalización se realiza en vacío, empleando para ello un sistema que consiste en una bomba rotatoria que alcanza una presión de 3×10^{-2} mbar y una trampa de nitrógeno líquido (figura 2.3, 7). Para dar comienzo a la deposición, se comienza a evaporar el APTS y se hace pasar un flujo de argón, controlado por una válvula de aguja (figura 2.2, 1), a través del equipo hasta que se alcanza la presión seleccionada para realizar la deposición. Tras la deposición, las muestras se limpian dos veces con tolueno y una vez con etanol durante 3 minutos en cada caso, empleando ultrasonidos solamente en el caso de los sustratos de silicio. Los sustratos de silicio monocristalino funcionalizados se conservan en etanol y los de silicio poroso en la cámara seca, siempre en oscuridad, para evitar la degradación de los grupos amino por efecto de la luz UV.

De lo anterior se deduce que los parámetros que controlan el proceso de deposición son: temperatura de evaporación del precursor (T_{evap}), temperatura de activación (T_{act}), presión del sistema una vez introducido el gas de arrastre (P_{Ar}) y tiempo de deposición. Durante el estudio y caracterización de las películas obtenidas, estos parámetros se han variado dentro de los siguientes rangos: T_{evap} : 130 - 190°C, T_{act} : 650 - 800°C y P_{Ar} : 0.1- 4 mbar. Los límites inferiores de las temperaturas de evaporación y activación se han establecido a partir del estudio de los espectros de infrarrojo, escogiendo aquellas temperaturas para las cuales se detecta capa orgánica depositada, independientemente de que sean funcionales o no. Como límite superior de temperatura de evaporación se escogió aquella para la cual se observa una clara disminución en la concentración de grupos amino reactivos, así como de la homogeneidad en su distribución. El límite superior de temperatura de activación, 800°C, es la temperatura a partir de la cual el espesor de las capas resultantes supera el espesor crítico y se obtienen capas resquebrajadas. El valor inferior de presión del gas de arrastre queda limitado por la bomba empleada. Puesto que la presión última que se alcanza en el sistema es de 3×10^{-2} mbar, el límite inferior de trabajo se fijó en 1×10^{-1} mbar, 3 veces por encima de la presión última, asegurándose de este

modo un flujo apreciable de APTS evaporado. El límite superior viene fijado por el valor de la presión a partir del cual las propiedades de funcionalidad de las capas depositadas empeoran significativamente, lo que ocurre a partir de 4 mbar. La variación de los parámetros se realiza uno a uno, partiendo de unos valores determinados y llamados condiciones de referencia (CR), que son los siguientes: temperatura de evaporación (T_{evap}) = 150°C, temperatura de activación (T_{act}) = 750°C y presión del gas de arrastre (P_{Ar}) = 1 mbar. Estas condiciones han dado como resultado una óptima funcionalización en una serie de pruebas preliminares sobre sustratos de silicio monocristalino.

Por último, el tiempo de deposición se ha variado entre 5 y 30 minutos, si bien en la mayor parte de los casos se ha empleado un valor de 20 minutos, puesto que con ese valor se han obtenido capas que recubren completamente la superficie en todos los casos estudiados.

2.3. Preparación de los sustratos de silicio nanoestructurado y macroporoso.

El silicio poroso se prepara por ataque electroquímico de obleas comerciales de silicio tipo p (dopadas con boro) y orientación (100). El ataque se lleva a cabo en una celda electrolítica de teflón (figura 2.4), resistente al ácido fluorhídrico, haciendo pasar una corriente de anodización regulada mediante un potencióstato/galvanostato HG&G modelo 263 controlado por un ordenador.

El contacto eléctrico necesario para la anodización se realizó depositando sobre la cara posterior de la oblea de silicio una capa de aluminio con un espesor de unos pocos nanómetros mediante evaporación por haz de electrones. Posteriormente, se realiza un tratamiento térmico en atmósfera de nitrógeno a 300°C, para favorecer la difusión del aluminio en el silicio y conseguir un contacto óhmico de baja resistividad.

Las obleas de silicio se cortan en piezas de 0.81 cm² de área para realizar la anodización y se montan en un portamuestras de teflón (figura 2.5), situando la cara depositada con aluminio en contacto con el electrodo de cobre del portamuestras y la cara delantera expuesta al electrolito. El área de la parte expuesta y en contacto con el electrodo posterior de Cu es de 0.385 cm².

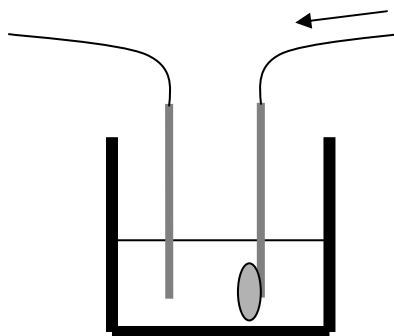


Figura 2.4: Esquema de la celda de teflón en la que se realiza el ataque electroquímico.

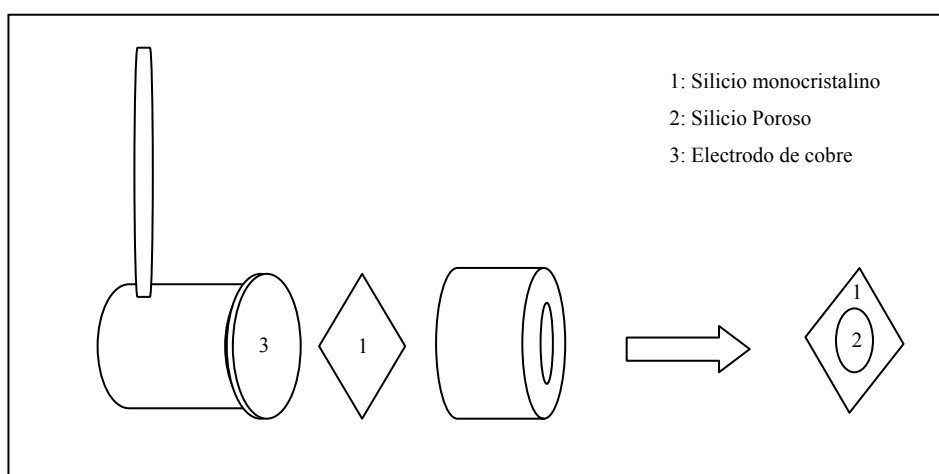


Figura 2.5: Esquema del portamuestras de teflón donde se colocan las piezas de silicio para realizar el ataque electroquímico.

A lo largo de este trabajo de Tesis, se ha empleado silicio mesoporoso o nanoestructurado (SP_n) que tiene un tamaño de poro entre 10 y 50 nm, y silicio poroso macroporoso (SP_M), con tamaño de poro en torno a 1 μm . Para la fabricación de SP_n , se emplean obleas de silicio de baja resistividad (0.05-0.1 $\Omega \cdot cm$). El electrolito utilizado consiste en una disolución de ácido fluorhídrico al 48% y etanol absoluto, en proporciones volumétricas iguales [8, 9]. La densidad de corriente utilizada es de 80 mA/cm² y los tiempos de ataque electroquímico se varían entre 10 segundos y 3 minutos. En todos los casos, las muestras se anodizan con iluminación proporcionada por una lámpara halógena de 25 W situada a 20 cm de la celda de teflón. Tras el ataque electroquímico, las muestras se secan en atmósfera de nitrógeno. El SP_M se ha formado a partir de obleas de silicio con resistividad 4-6 $\Omega \cdot cm$ [10]. En este caso, el electrolito empleado contiene, además de ácido fluorhídrico, un disolvente orgánico aprótico (disolvente de elevada polaridad que no

tienen ningún H capaz de formar enlaces de hidrógeno) y protofílico (aceptor de protones), dimetilformamida (DMF: C_2H_6NCOH), con una composición y concentración 4 M de ácido fluorhídrico, 4.8 M de agua y dimetilformamida [11]. Para realizar el ataque electroquímico, se empleó una densidad de corriente de 10 mA/cm^2 y un tiempo comprendido entre 450 y 600 segundos, iluminando las muestras, en las mismas condiciones que en el caso de SP_n . Las muestras obtenidas en estas condiciones presentan una capa superficial nanométrica de silicio mesoporoso [11] que se elimina sumergiendo las muestras en KOH.

2.4. Técnicas de caracterización.

En este apartado se describen las técnicas de caracterización empleadas a lo largo de esta Tesis para evaluar las propiedades de los sustratos tanto antes como después de ser sometidos a las diversas técnicas de biofuncionalización.

2.4.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM: Scanning Electron Microscopy) permite obtener imágenes que ofrecen información tridimensional de las superficies con una resolución de unos pocos nanómetros. Para ello, las muestras se bombardean con un haz de electrones que es dirigido y enfocado por lentes magnéticas. Este haz realiza un barrido punto por punto de la superficie de la muestra y se analizan los electrones emitidos, tanto los secundarios (dan información de la topografía) como los retrodispersados (que dan información de los distintos elementos). Esta técnica permite estudiar simultáneamente las desexcitaciones de rayos X, por espectroscopia dispersiva de rayos X (EDAX), para hacer un análisis químico de las muestras.

Las imágenes presentadas en esta memoria de Tesis, se tomaron empleando un microscopio electrónico de barrido Philips XL30, acoplado a un analizador EDAX DX4i. Las medidas se realizaron sobre la superficie de las muestras, para obtener información de su topografía, y en sección transversal, para estudiar sus espesores. Las imágenes en sección transversal se obtuvieron cortando las muestras por la parte central, empleando una punta de diamante. Debido a la baja conductividad de las muestras analizadas, fue

necesario metalizar su superficie con oro. Para ello se empleó un Sputter Coater SC502. El espesor de la capa de oro resultante es de aproximadamente 370 Å.

2.4.2. Microscopio de fuerzas atómicas (AFM)

El microscopio de fuerzas atómicas (AFM: atomic force microscope) se basa en la interacción entre una punta de tamaño nanométrico y la superficie de estudio [12]. Dicha punta se ensambla a un fleje o *cantilever* flexible, con una constante de elasticidad específica, integrado a su vez en un sistema de piezoeléctricos de desplazamientos (x, y, z) de alta precisión. La punta se mueve realizando un barrido por la superficie y se registran las variaciones del cantilever en la dirección z, relacionadas con la variación en la interacción punta-superficie, lo que permite obtener información de la superficie con resolución nanométrica. El AFM se emplea frecuentemente en el estudio de biomateriales, debido a la versatilidad en el tipo y la forma de realizar las medidas: en aire o en líquidos, en modo contacto o en modo contacto intermitente (*tapping*), etc y a la posibilidad de funcionalizar las puntas.

Las medidas presentadas en esta memoria fueron realizadas con un microscopio Nanoscope IIIa (Veeco). Las puntas empleadas fueron de silicio y el modo de medida fue de contacto intermitente (*tapping*) al aire. En este modo se confiere un movimiento oscilatorio en la punta, con una frecuencia y amplitudes determinadas. Al desplazarse a lo largo de la superficie, la punta entra en contacto con ésta, produciendo una pérdida de la energía de oscilación, que se traduce en una disminución de la amplitud. Las variaciones en la amplitud se utilizan para caracterizar la morfología superficial. La frecuencia de la medida empleada fue 1.5-2.0 Hz.

A partir de las imágenes obtenidas se puede calcular la rugosidad superficial RMS que se define como la desviación cuadrática media de las alturas respecto al plano medio de la superficie, evaluada para cada punto de la superficie, dividida en $N_x N_y$ puntos.

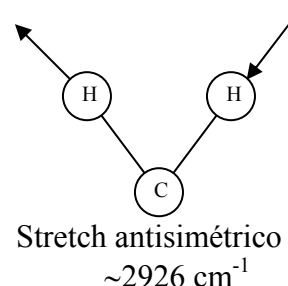
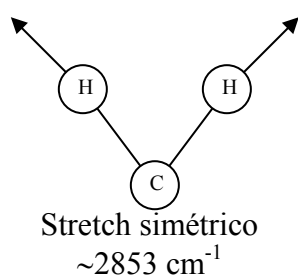
$$RMS = \sqrt{\frac{1}{N_x N_y} \sum_{N_x} \sum_{N_y} Z^2(i, j)} \quad (2.1)$$

2.4.3. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

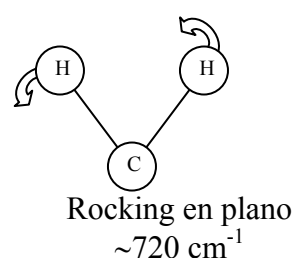
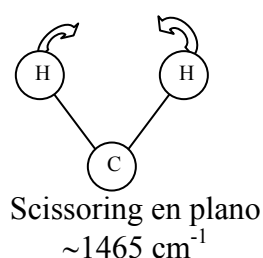
La espectroscopía de infrarrojos (FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy) es una técnica de análisis empleada para identificar la presencia de distintos compuestos, a

partir del estudio de las absorciones ópticas relacionadas con vibraciones moleculares. Estas vibraciones se producen siguiendo un movimiento armónico, con una frecuencia asociada que es característica de los átomos que forman el enlace, de la intensidad con que están enlazados y del tipo de vibración que experimentan las moléculas [13, 14]. Los distintos modos de vibración de los átomos se pueden clasificar en:

- *Stretch* (ν): movimiento oscilatorio de los átomos a lo largo de la línea que los une. Este tipo de vibración puede ser a su vez simétrica o antisimétrica. En la figura se ilustran ejemplos de estos tipos de vibración para el grupo CH_2 .



- *Bend* o *wagg* (δ): movimiento por el cual se produce una variación en el ángulo formado por las líneas que unen varios átomos. Se llama *scissoring* en el caso en el que los átomos se mueven como si estuvieran en los extremos de unas tijeras que se abren y cierran. Se dice *rocking* en el caso en que los átomos se mueven en la misma dirección. Este tipo de vibración puede ser a su vez en el mismo plano, o fuera de plano. A continuación se muestran las vibraciones anteriores en la molécula CH_2 .



Las bandas de absorción infrarroja que aparecen en el rango $1500\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ corresponden a los grupos funcionales, con independencia de la moléculas en que se encuentren, y las bandas en el rango comprendido entre $400\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$, corresponden con las absorciones específicas de cada molécula.

Además de la identificación de los enlaces presentes en las muestras estudiadas, las medidas de FTIR permiten realizar un análisis semi-cuantitativo de las mismas, a partir del área bajo la curva de las bandas de absorción obtenidas en los espectros medidos en el

modo absorbancia (Abs). El área obtenida se relaciona con la concentración del enlace correspondiente mediante la ley de Lambert-Beer:

$$Abs = c \cdot \alpha \cdot d \quad (2.2)$$

donde c es la concentración molar, α es el coeficiente de extinción molar en $M^{-1}cm^{-1}$ y d el espesor del material en cm.

El equipo empleado para las medidas expuestas a lo largo de esta memoria fue un Espectrómetro FT-IR Bruker IFS60v. Este equipo trabaja en vacío con el fin de eliminar interferencias atmosféricas y proporcionar una elevada sensibilidad. Las medidas se hicieron en transmitancia (T ; $Abs = -\log T$), eliminando previamente la capa de aluminio depositada en la parte posterior de las muestras mediante ácido fluorhídrico. Las condiciones de medida fueron: 300 scans, resolución 4 cm^{-1} y apertura del haz: 1 mm. En todos los casos, las medidas se realizaron tomando como referencia la lámpara del equipo. Para el posterior análisis de los espectros, cada uno de ellos se referenció al espectro del sustrato de Si monocristalino correspondiente. El análisis del área bajo la curva se hizo empleando el programa Origin 7.5Pro, ajustando las bandas de absorción mediante gaussianas.

2.4.4. Espectroscopía de retrodispersión de Rutherford (RBS) y análisis de retroceso elástico (ERDA).

Las espectroscopías de iones retrodispersados (RBS: Rutherford Backscattering spectroscopy) y de retroceso elástico (ERDA: Elastic Recoil Detection Analysis) son espectroscopías basadas en la interacción entre un haz iones que se hace incidir sobre una muestra de estudio y los átomos y moléculas que componen dicha muestra [15, 16].

La espectroscopía RBS detecta el cambio de energía sufrido por los iones incidentes tras ser retrodispersados elásticamente por los núcleos de la muestra. El cambio de energía asociado a dicha retrodispersión, es decir, el cociente entre la energía de los iones antes (E_i) y después de la colisión (E_o), depende de las masas de los iones incidentes (M_i) y de los átomos de la muestra (M_m), así como del ángulo que forman el haz incidente y el detector (θ). Estas magnitudes se relacionan entre sí mediante el llamado factor cinemático K_M :

$$K_M = \frac{E_o}{E_i} = \left[\frac{M_i \cos \theta + \sqrt{M_m - M_i^2 \sin^2 \theta}}{M_i + M_m} \right]^2 \quad (2.3)$$

A partir del factor cinemático, se puede determinar la composición superficial de la muestra de estudio, debido a que la interacción de los iones incidentes con cada elemento de la muestra produce una pérdida de energía característica en los mismos. En el caso de los iones que interaccionan con elementos de la muestra que están a una cierta profundidad x , la energía con la que éstos llegan al detector depende de la pérdida de energía en el camino de entrada $(dE/dx)_i$, de la pérdida de energía asociada a la retrodispersión con los distintos elementos $K_M[E_i - x(dE/dx)_i]$ y la pérdida de energía en el camino de salida $(dE/dx)_o$:

$$E_D(x) = K_M \left[E_{i,x=0} - \left(\frac{dE}{dx} \right)_i x \right] - \left(\frac{dE}{dx} \right)_o \frac{x}{\cos \theta} \quad (2.4)$$

La cuantificación de los elementos que componen el material se realiza a partir de la intensidad de los espectros. En particular, el número de átomos por unidad de área (N_s) se relaciona con dicha intensidad (Y) mediante el ángulo sólido del detector (Ω), la relación entre la carga total de iones incidentes y la carga por ion (Q/q_e) y la sección transversal de dispersión, $(\sigma(\theta))$:

$$Y = \sigma(\theta) \Omega \left(\frac{Q}{q_e} \right) N_s \quad (2.5)$$

De cara al análisis de las películas biofuncionales obtenidas mediante las técnicas explicadas en el apartado 2.2, la espectroscopía RBS presenta como limitación que no se pueden detectar elementos con masa menor a la de los iones incidentes (He^+). Por tanto, para poder cuantificar el H presente en las muestras funcionalizadas, se han realizado experimentos de ERDA. En estos experimentos se mide la energía de los átomos que proceden del material, como consecuencia de la interacción entre éstos y los iones incidentes. La pérdida de energía asociada a la colisión entre los iones incidentes y los átomos del material cuya masa es menor a la de dichos iones, se expresa a partir del factor cinemático k (2.6), donde E_o es la energía del átomo procedente de la muestra, E_i es la energía de los iones incidentes, m y M son las masas del ion incidente y del átomo procedente del material respectivamente, θ el ángulo de retrodispersión:

$$k_M = \frac{E_o}{E_i} = \frac{4mM}{(m+M)^2} \cos^2 \theta \quad (2.6)$$

La cuantificación del hidrógeno a partir de los espectros de ERDA se realiza, como en el caso de RBS, a partir de la intensidad de los espectros.

Para caracterizar las películas biofuncionales, se realizaron experimentos de RBS y ERDA simultáneos que permiten detectar todos los elementos que componen el APTS: Si, O, C, N y H. Para ello, se empleó una disposición geométrica en la que pueden realizarse ambos tipos de medidas simultáneamente, figura 2.6. Para comenzar el análisis, se llevaron a cabo varias series de medidas empleando iones de He^+ con una energía de 2 MeV, y un ángulo de incidencia respecto a la normal $\alpha = 75^\circ$. A continuación se realizó una segunda serie de medidas, empleando iones con una energía de 3.7 MeV y un ángulo de incidencia de 45° . Para el análisis de esta segunda serie de medidas, se empleó la sección eficaz no-Rutherford, que permite cuantificar las señales de C, N y O en las simulaciones de ajustes de los espectros con una mayor sensibilidad. Para realizar dichas simulaciones se empleó el programa SIMNRA 5.02 [17].

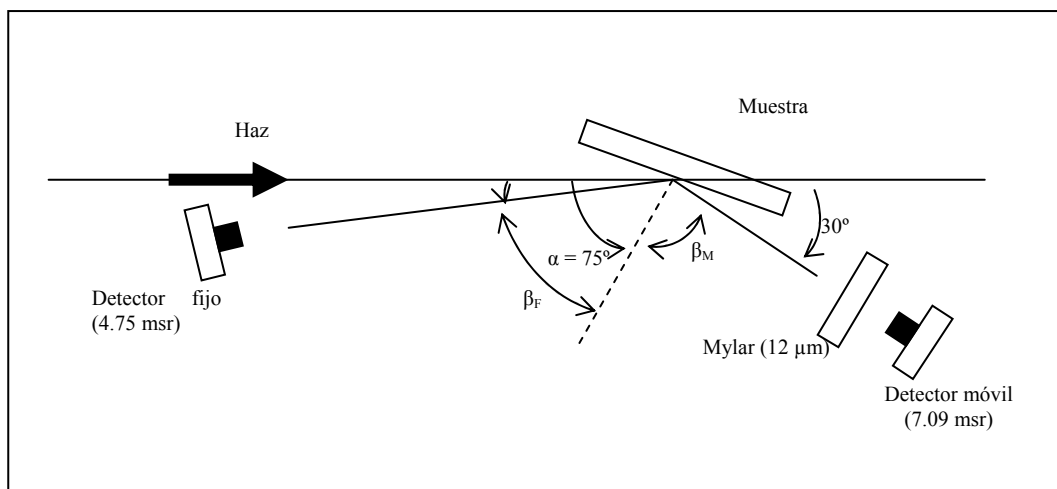


Figura 2.6: Esquema de la geometría empleada para realizar simultáneamente las medidas de RBS y ERDA.

2.4.5. Espectroscopía de fotoemisión de rayos X (XPS).

La espectroscopía de fotoemisión de rayos X (XPS: X-Ray Photoelectron Spectroscopy) es una potente técnica de análisis que permite diferenciar estados de oxidación y/o situaciones del entorno (coordinación) de los átomos en la superficie de las

muestras sólidas analizadas. Además permite el estudio de perfiles de composición combinando esta técnica con el bombardeo iónico de la superficie de estudio [18, 19].

Esta técnica de análisis, que se basa esencialmente en el efecto fotoeléctrico, consiste en irradiar las muestras con un haz monoenergético de rayos X. Este haz interacciona con los átomos presentes en la superficie de la muestra produciendo la emisión de electrones, cuya energía es analizada. A partir de las posiciones en energía a las que se detectan los electrones emitidos, se pueden identificar los elementos presentes en las muestras, así como su entorno químico. Dichas posiciones teóricas se calculan mediante la expresión:

$$K \cdot E = h\nu - B \cdot E - \phi_s \quad (2.7)$$

donde KE es la energía cinética de los electrones emitidos, $h\nu$ es la energía de los fotones incidentes, BE es la energía de enlace del orbital atómico del cual procede el electrón emitido y ϕ_s es la función de trabajo del espectrómetro, que tiene un valor constante conocido.

El análisis cuantitativo se hace teniendo en cuenta que la intensidad obtenida en un espectro XPS es proporcional a la densidad atómica [A], la sección eficaz de los fotoelectrones σ , su recorrido libre medio λ y a la función de transmisión de energía del analizador T, es decir:

$$I_A = [A] \sigma_A T \lambda_A \quad (2.8)$$

Para realizar el análisis cuantitativo, se toma el cociente entre dos elementos, escogiéndose uno de ellos como referencia para el análisis:

$$\frac{[A]}{[B]} = \frac{I_A \sigma_B^* \lambda_B}{I_B \sigma_A^* \lambda_A} \quad (2.9)$$

El análisis de XPS de las muestras obtenidas mediante la funcionalización por inmersión en disoluciones de APTS en tolueno (capítulo 4) se realizó empleando un espectrómetro AXIS ULTRA Spectrometer (KRATOS Analytical, UK) equipado con un ánodo de Al ($K\alpha$ 1486.6 eV). La presión de trabajo de la cámara es inferior a 4×10^{-9} mbar. El ángulo formado entre la muestra y el analizador es de 90° . El espectro general se midió con una energía de paso de 160 eV y los espectros de alta resolución con una energía de paso de 20 eV. La composición elemental se ha determinado con una precisión del 10% para cada especie química.

El análisis de XPS de los sustratos de silicio poroso (capítulo 3) y de las muestras resultantes de la funcionalización por TACVD (capítulo 5) se realizó empleando un espectrómetro equipado con un ánodo de Mg ($K\alpha$ 1253.6 eV), haciendo incidir un haz de rayos X generado a 15 kV y a una presión de trabajo de la cámara inferior a 10^{-8} mbar. El ángulo formado entre el analizador y la muestra es de 90° . El espectro general se midió con una energía de paso de 150 eV, mientras que los espectros de alta resolución de cada uno de los elementos se midieron con una energía de paso de 20 eV. Los espectros se obtuvieron para cada muestra en su estado original y después de un bombardeo con iones de Ar^+ acelerados con una energía de 5 keV. El tiempo de bombardeo de la superficie fue de 0.5, 1, 5, 10 y 15 minutos. El análisis de los espectros de alta resolución se realizó sobre los espectros obtenidos tras cinco minutos de bombardeo, que es el tiempo idóneo para eliminar el carbono adventicio depositado sobre la superficie, y el ajuste de los picos empleando una función Gaussiana pura. La composición elemental se ha determinado con una precisión del 5% para cada especie química.

2.4.6. Microscopía de fluorescencia y confocal.

La microscopía de fluorescencia permite detectar la presencia de fluoróforos con resolución espacial en dos y tres dimensiones. Los fluoróforos son moléculas fluorescentes que se caracterizan por absorber la luz en una determinada longitud de onda y reemitirla en otra más larga. La intensidad y color de emisión de los fluoróforos es un rasgo distintivo de cada uno de ellos.

El microscopio de fluorescencia consta de tres componentes característicos: un filtro de excitación, que selecciona la luz incidente, un espejo dichroico, que refleja luz y un filtro de emisión, que selecciona la luz fluorescente, en todos los casos con una longitud de onda determinada en función del fluoróforo empleado [20].

Un caso particular de microscopio de fluorescencia es el microscopio confocal (figura 2.7), que se caracteriza porque permite obtener imágenes de secciones ópticas muy finas, así como hacer proyecciones de distintos planos de la muestra mediante un juego de diafragmas y un sistema electrónico de captación de imágenes. Además, la excitación se realiza mediante fuentes de iluminación de gran intensidad y sincrónicas (en general un láser).

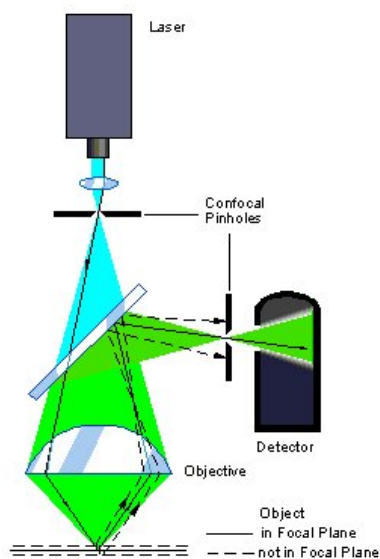


Figura 2.7: Esquema de un microscopio confocal.

En este trabajo de Tesis se presentan imágenes obtenidas mediante un microscopio de fluorescencia y mediante un microscopio confocal. El microscopio de fluorescencia empleado es un microscopio vertical Axioskop2 plus (Zeiss) acoplado a una cámara CCD color para captar las imágenes y el microscopio confocal es un Microradiance (BioRad) acoplado a microscopio vertical Axioskop2 (Zeiss). En el primer caso, la optimización de las imágenes se realiza mediante el ajuste de los siguientes parámetros: rango de verde y tiempo de exposición. En el microscopio confocal, el ajuste se realiza mediante cuatro parámetros: el láser (controla la potencia del láser empleado como fuente de excitación), el iris (ajusta el diafragma del equipo de forma que permite ajustar el plano de la muestra que estudiamos), la ganancia (controla la sensibilidad y la limpieza del fondo de la imagen) y el offset (varía la escala de grises de las imágenes). En las imágenes que se muestran a lo largo de este trabajo, los valores del láser y el iris se mantuvieron fijos a 3 y la ganancia y el offset se variaron para optimizar las imágenes.

El fluoróforo empleado para evaluar la funcionalidad de las muestras fue el isotiocianato de fluoresceína (FITC), cuya fórmula se muestra en la figura 2.8. Esta molécula contiene un grupo isotiocianato ($\text{N}=\text{C}=\text{S}$) que reacciona selectivamente con los

grupos amino: $\text{GF-N}=\text{C}=\text{S} + \text{R-NH}_2 \rightarrow \text{GF-NH-CO-R}$ y tres anillos benceno responsables de la fotoluminiscencia de la molécula.

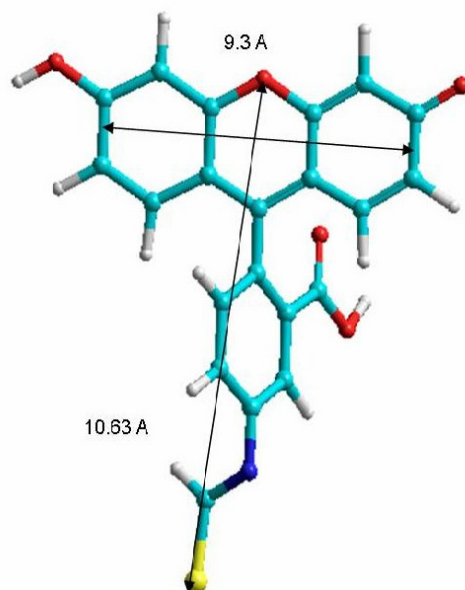


Figura 2.8: Molécula isotiocianato de fluoresceína. Los átomos representados en azul con C, los rojos son O, los blanco H y el amarillo N.

La intensidad y la distribución de la fluorescencia obtenida se relacionan con la concentración superficial y la distribución de los grupos amino funcionales sobre la superficie. La preparación de las muestras con FITC se realiza incubando durante 20 minutos las muestras con 200 μl de una disolución que contiene 1 mg de FITC por ml de disolución tampón de fosfato (PBS: 100 mM, pH = 9). A continuación se lavan dos veces con PBS durante 5 minutos. El PBS se prepara de la siguiente forma: 1.09g de Na_2HPO_4 (anhidro), 0.32 g de NaH_2PO_4 (anhidro), 0.9 g de NaCl y 1 l de agua destilada, obteniendo una disolución 0.1M PBS y con pH = 7.2.

En algunos casos, los materiales empleados muestran autofluorescencia. Para eliminarla los sustratos se sumergen en una disolución 50 mM de cloruro amónico (NH_4Cl) en PBS pH 8.0, durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavan con PBS y se prosigue con el protocolo usual de fluorescencia.

2.4.7. Absorbancia en el ultravioleta

La segunda técnica empleada para evaluar la reactividad superficial de los grupos amino depositados mediante las distintas técnicas de funcionalización, se basa en la reacción entre éstos y moléculas de 4-nitrobenzaldehído ($\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CHO}$). Mediante la

transformación de los grupos amino ($-\text{NH}_2$) en iminas sustituidas con un grupo nitrobenzil ($-\text{N}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$), se consigue que las superficies funcionalizadas absorban en longitudes de onda del rango ultravioleta-visible. De esta forma, midiendo la absorbancia en dicho rango y empleando la ley de Lambert-Beer (2.2), se puede estimar la concentración superficial de grupos amino. Para realizar estas medidas, los sustratos empleados fueron láminas de *fused silica* (FS), que tienen una elevada transmitancia en el rango de medida.

La formación de iminas se realiza incubando las muestras funcionalizadas en una disolución que contiene 25 ml de metanol anhidro (CH_3OH), 10 mg de 4-nitrobenzaldehído, 0.02 ml de ácido acético (HCH_2COOH) y 1 g de tamiz molecular (*molecular sieves*, de 4\AA). Las muestras se dejan durante 3 horas a 50°C . Transcurrido este tiempo, se enjuagan y se lavan con metanol en ultrasonidos durante 2 minutos. A continuación se secan en atmósfera de N. En la figura 2.9 se muestra un esquema de la molécula de nitrobenzaldehído y la reacción que tiene lugar con este proceso:

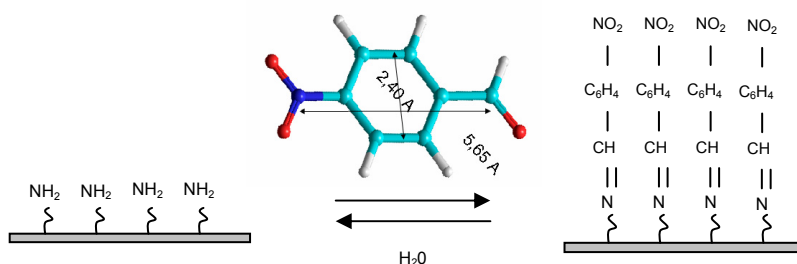


Figura 2.9: Esquema del proceso de formación de iminas.

El proceso de formación de iminas es reversible en presencia de agua, de forma que los enlaces formados se pueden hidrolizar, lo que permite reutilizar las superficies. Para ello, se sumergen las muestras en una disolución que contiene 0.02 ml de ácido acético en agua durante 1 hora a 30°C .

2.4.8. Interacción sustrato-estructura biofuncional.

Para determinar la intensidad de la interacción entre el sustrato y las estructuras biofuncionales obtenidas mediante inmersión, se estudió el comportamiento de dichas muestras al sumergirlas en disoluciones acuosas, con distintos valores de fuerza iónica. La fuerza iónica se calcula mediante la expresión: $I = \frac{1}{2}(\sum c_i z_i^2)$, donde c_i son las concentraciones en M (mol/l) de los iones presentes y z_i su carga. Dicha fuerza iónica es un

indicativo de la actividad de los iones, que es competitiva con la interacción sustrato/depósito biofuncional. De este modo, la respuesta de los sustratos funcionalizados frente a la fuerza iónica, permite conocer la intensidad de la interacción de las capas funcionales con los sustratos. Para ello, los sustratos funcionalizados se incubaron con FITC (siguiendo el proceso del apartado 2.4.6) y se sumergieron durante 20 días en disoluciones con distintas concentraciones salinas. Como el enlace entre la FITC y los grupos amino es covalente, la fluoresceína que se detecte en la disolución, procede de los depósitos funcionales que se han desprendido del sustrato. La concentración de FITC en la disolución se ha calculado midiendo la absorbancia de la disolución y empleando la ley de Lambert-Beer (2.2). Para hacer los cálculos de la concentración de FITC en disolución, se tomó la absortividad molar de la fluoresceína para $\lambda = 494 \text{ nm}$, es decir, $765 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La preparación de las disoluciones con distintas concentraciones salinas se realizó empleando agua destilada, etanol (EtOH), cloruro sódico (NaCl) y TrisHCl como buffer salino, en las cantidades recogidas en la tabla 2.1:

Disol.	H ₂ O mQ (ml)	EtOH (ml)	Tris HCl (μl)	NaCl (μl)	[NaCl] (mM)	FI
1	7.50	7.50	30	0	0	0
2	7.35	7.35	30	150	50	0.05
3	7.30	7.30	30	300	100	0.1
4	7.15	7.15	30	600	200	0.2
5	6.70	6.70	30	1500	500	0.5

Tabla 2.1: Reactivos y volúmenes empleados para preparar disoluciones con distinta fuerza iónica.

2.5. Bioactividad y ensayos biológicos.

En este último apartado, se explican los ensayos realizados para evaluar el comportamiento de los materiales al interaccionar con disoluciones salinas que mimetizan el plasma sanguíneo y con diversos sistemas biológicos. En cada uno de los ensayos se explica brevemente cómo se realizó y a continuación se incluye el protocolo correspondiente en el que se detallan todos los pasos llevados a cabo.

2.5.1. Bioactividad.

La bioactividad de las muestras se estudió a partir de los ensayos desarrollados por Kokubo [21]. Estos ensayos consisten en evaluar la precipitación de fosfato cálcico tras sumergir los materiales en una disolución que simula el plasma sanguíneo humano y que se denomina *Simulated Body Fluid* (SBF). El SBF es un fluido con una concentración salina muy parecida a la del plasma sanguíneo humano (tabla 2.2):

Ion	Concentración en SBF (mM)	Concentración en plasma sanguíneo (mM)
Na^+	142,0	142,0
K^+	5,0	5,0
Mg^{2+}	1,5	1,5
Ca^{2+}	2,5	2,5
Cl^-	147,8	103,0
HCO_3^-	4,2	27,0
HPO_4^{2-}	1,0	1,0
SO_4^{2-}	0,5	0,5

Tabla 2.2: Concentraciones iónicas del SBF y del plasma sanguíneo humano.

Los reactivos empleados en la preparación del SBF, así como las cantidades correspondientes, se indican en la tabla 2.3. El resultado es una disolución con $\text{pH} = 7.4$ a 37°C (temperatura del cuerpo humano) [22]:

Reactivo	Cantidad (g)/ $1\text{ dm}^3 (\text{H}_2\text{O})$
NaCl	7,995
NaHCO_3	0,353
KCl	0,224
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	0,228
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,305
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,368
Na_2SO_4	0,071
HCl, 2 M	20 mL
$(\text{CH}_2\text{OH})_3(\text{CNH}_2)_2$	6,055

Tabla 2.3: Reactivos y cantidades empleadas para preparar 1 litro de SBF.

Para realizar el ensayo, las muestras se dispusieron individualmente en los pocillos de una placa de cultivos celulares, M24, y se incubaron con 3 ml de SBF a 37°C durante 18 días. Transcurrido ese tiempo, se enjuagaron en agua desionizada, se secaron en atmósfera de nitrógeno y fueron analizadas mediante SEM y EDAX.

2.5.2. Inmovilización de proteínas.

La interacción entre los sustratos de silicio monocristalino y silicio poroso (antes y después de ser funcionalizados) y proteínas se estudió empleando γ -inmunoglobulinas de ratón. Para inmovilizar estas proteínas sobre la superficie de las distintas muestras se empleó un agente entrecruzante de longitud cero, 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide (EDC), que cataliza la reacción para formar enlaces covalentes entre los grupos amino superficiales y las proteínas. La cantidad de proteína inmovilizada se ha detectado mediante microscopía de fluorescencia (apartado 2.4.6) utilizando un anticuerpo anti-ratón marcado con fluoresceína. El protocolo completo de inmovilización de proteínas es el siguiente:

Inmovilización de proteínas (gamma inmunoglobulina de ratón): Las muestras se lavaron dos veces sumergiéndolas en 1 ml de ácido 2-(N-morfolino)etenosulfónico (MES, disolución tampón salina, 0.1 M, pH = 4.5-5) durante 30 minutos. A continuación se disolvieron 10 mg de EDC en 1 ml de agua desionizada. Se preparó una disolución con 100 μ l de proteínas de ratón (3mg/ml) y 400 μ l de MES y se añadieron 200 μ l a la disolución formada por 10 mg de EDC en 1 ml de agua desionizada. Cada muestra se incubó con los 700 μ l resultantes durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron dos veces con Tris-buffer salino (TBS: 150 mM NaCl y 10 mM Tris-HCl, pH 7.5.) y se conservaron en PBS (ver apartado 2.5.6) a 2-3°C.

Inmovilización del anticuerpo anti-ratón marcado con fluoresceína. Las muestras anteriores se sumergieron en una disolución de 1 ml de leche 5% (0.05g en 1 ml de TBS 1x) durante 2 horas para bloquear las interacciones inespecíficas de adsorción. A continuación se lavaron dos veces en 1 ml de una disolución de leche al 0.5% en TBS durante cinco minutos con agitación. Tras el lavado, las muestras se incubaron durante 30 minutos en oscuridad con 1 ml de una disolución de anticuerpo 1/2500 (4 μ l en 10 ml) en leche al 0.5%. Después se lavaron durante cinco minutos en 1ml de leche al 0.5% y seguidamente en TBS. Para realizar la detección por fluorescencia, las muestras se montaron sobre un portaobjetos de cristal utilizando mowiol (resina termoplástica) y se guardaron a 2-3°C en oscuridad al menos 12 horas antes de ser analizadas en un microscopio de fluorescencia.

2.5.3. Inmovilización de ADN.

Para estudiar la inmovilización de ácidos nucleicos sobre la superficie de los sustratos de silicio monocristalino y silicio poroso, antes y después de ser funcionalizados, se ha empleado ADN, en particular un fragmento del gen de la β -actina humana amplificado por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), que se encuentra entre los pares de bases 844 y 1198 (357 pb). El ADN problema se desnaturalizó y se fijó a la superficie, activando la reacción con luz UV [23]. La detección se llevó a cabo por fluorescencia, para lo cual una de las hebras del ADN se marca por PCR con digoxigenina (DIG), empleando el kit comercial PCR DIG Probe Síntesis Kit, de Roche. Este kit contiene una mezcla de nucleótidos, de los cuales el dUTP está unido a digoxigenina. La digoxigenina a su vez se detecta por fluorescencia empleando un kit comercial de detección de DIG: Fluorescent Antibody Enhancer Set for DIG Detection de Roche.

Inmovilización de ADN sobre la superficie: La superficie de las muestras se lavó con PBS. Para ello, las muestras se dispusieron en placas M24 y se lavaron 3 veces a temperatura ambiente utilizando un volumen adecuado de PBS para cubrirlas bien. A continuación, se llevó a cabo la inmovilización de ADN. Para ello se prepara una disolución de ADN, a partir de una disolución estándar que contienen 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN en TE, que se desnaturaliza a 94°C durante 5 minutos. Tomando un stock de esta disolución de concentración 40 $\text{ng}/\mu\text{l}$, se prepararon disoluciones con distintas concentraciones: 2 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 0.2 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 0.02 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 0.002 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Para llevar a cabo la inmovilización se añadió sobre la superficie de cada muestra un volumen de 300 μl de las disoluciones anteriores y se empleó una lámpara de luz ultravioleta ($\lambda = 232 \text{ nm}$), situada a 15 cm de la superficie de las muestras, durante 5 min. Para terminar, las muestras se lavaron tres veces con PBS y se dejaron sumergidas en él hasta realizar el siguiente paso.

Prehibridación: Las muestras se incubaron con 500 μl del buffer de prehibridación (tabla 2.4) a 42°C durante 2 horas.

El ADN de hebra simple se desnaturalizó previamente manteniéndolo a 94°C durante cinco minutos y enfriando a continuación. Una vez preparada la mezcla de prehibridación se mantuvo a 65°C.

	Concentración final	10 ml	20 ml	40 ml
PIPES salt	20%	2 ml	4 ml	8 ml
H ₂ O		2.3 ml	4.5 ml	9.2 ml
Formamida	50%	5 ml	10 ml	20 ml
SDS 10%	0.5%	0.5 ml	1 ml	2 ml
ssDNA (10 mg/ml)	0.2 mg/ml	200 µl	400 µl	800 µl

Tabla 2.4: Reactivos y volumen necesarios para preparar la mezcla de prehibridación. *PIPES Salt*: sal de sodio, Piperrazina-N,N'-bis(2- ácido etanosulfónico), *Formamida*: Amida del ácido fórmico CH₃NO/HCONH₂, *SDS*: detergente sodiododecilsulfato.

Hibridación: Las muestras se incubaron durante 12 horas a 42°C con 50 µl/muestra de la siguiente disolución: 10 µl de la sonda marcada con DIG (preparada por PCR a partir de 25 ng/µl de cADN) que se diluyen en 1ml de una solución que contiene: 50% de Formamida desionizada, 2x de SSC, 10% dextran sulfato, 50 mM fosfato sódico. El pH de esta disolución debe ser 7. La sonda se desnaturalizó previamente durante 5 minutos a 95°C y a continuación se enfrió rápidamente. Las muestras se incubaron en la cámara húmeda, montadas sobre los portamuestras y poniendo un cubremuestras encima de los 10 µl de la disolución de sonda, evitando la formación de burbujas.

Lavados post-hibridación: Se levantaron los cubres y las muestras se lavaron dos veces con 2xSSC en un baño a 42°C, con agitación durante 10 minutos. A continuación se lavaron dos veces con 0.1x SSC durante 10 minutos cada uno y se realizó un último lavado con el buffer que se vaya a utilizar en la detección, también durante 10 minutos. Finalmente se llevó a cabo la inmunotinción de las muestras.

2.5.4 Respuesta celular a las superficies de los sustratos.

Con el fin de evaluar el crecimiento y diferenciación de células sobre los sustratos de silicio monocristalino y silicio poroso, se emplean células mesenquimáticas humanas (hMSCs), obtenidas de la médula ósea de donantes adultos sanos. Las células se cultivaron en un medio Eagle modificado por Dulbelcco (DMEM) con un 1g/l de glucosa y suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), glutamina 2mM, 0.01 % de streptomycin, 0.06 % de penicilina G y 50 µg/ml de gentamicina. Las condiciones de crecimiento de las células son: 37 ° C, 5 % de CO₂ y 97% de humedad relativa. Una vez que las células están a un 80-90% de confluencia se pasan de una placa 1 p100 a 2 p100. Para ello se utiliza una mezcla de Tripsina-EDTA, previamente calentada a 37°C. Cuando

las células están levantadas, se inactiva la tripsina añadiendo FBS. Se recogen entonces las células en un Falcon y se centrifugan durante 5 minutos a 1200 rpm, a temperatura ambiente. Después se cuentan y se plaquean poniendo 15000 células/pocillo en una placa multipocillo M24. En esta placa se colocan las muestras cuya interacción con las células se va a evaluar y que se habían esterilizado previamente, sumergiéndolas en etanol absoluto.

A continuación, las células se dejan crecer, durante una semana aproximadamente, en un medio de crecimiento (F) o en un medio de diferenciación (D), que se cambia unas 2 veces por semana. El medio de crecimiento es medio normal con suero, mientras que el medio de diferenciación es DMEM que se prepara con 1 g/l. de glucosa, con 2mM de glutamina, 6.25 µg/ml insulina, 6.25 µg/ml transferrina, 6.25 ng/ml ácido selenioso, 1.25 mg/ml albúmina, 5.35µg/ml ácido linoleico, 1mM Piruvato, 400 µM aminoácidos no esenciales, 40 µg/ml ácido ascórbico, 0.01 % de streptomycin, 0.06 % de penicilina G y 50 µg/ml de gentamicina más dexametasona 100 nM

Transcurrida una semana, las muestras se lavan dos veces con PBS frío, concentración 1x. Para fijar las células a las superficies de las muestras, éstas son tratadas con Formalina al 10% (formaldehído, cuya concentración es del 37,5% en PBS 1X, con lo cual realmente la concentración final es del 3,75%), que se dejan 10 minutos en hielo y a continuación se lavan 2 veces con PBS 1X, con una duración de 5 minutos cada lavado. Finalmente se realiza la inmunotinción.

El efecto de las propiedades de las superficies sobre las células se analizó a partir de la disposición de las proteínas del citoesqueleto celular, marcadas mediante inmunofluorescencia empleando un protocolo análogo al del apartado anterior.

2.5.5. Crecimiento de hongos.

Para realizar este estudio, los distintos sustratos de silicio poroso, nanoestructurado y macroporoso, antes y después de funcionalizar, se incubaron en disoluciones que contenían hongos *Aspergillus*, empleando como medio de cultivo SBF a temperatura ambiente.

La presencia de los hongos sobre la superficie se evaluó por microscopía óptica empleando un microscopio Nikon Optiphot acoplado a una cámara CCD. El área de las imágenes obtenidas corresponde a 1 mm².

2.6. Bibliografía.

1. Microelectronic Materials and Processes. Chapter 5. Ed. R.A. Levy. NATO ASI Series. Applied Science- vol 164. Kluwer Academic Publishers, 1989.
2. Materials and Processes Surface and Interface Enginee. Ed. Y. Pauleau. NATO ASI Series. Applied Science- vol 290. Kluwer Academic Publishers, 1995.
3. G. García-Ayuso, R. Salvarezza, J.M. Martínez-Duart, O. Sánchez, L. Vázquez. Surface & Coatings Technology. 101 (1998), 1-3, 459-492.
4. M. Manso-Silvan, M. Arroyo-Hernández, V. Torres-Costa, R.J. Martin-Palma, J.M. Martinez-Duart. Europhysics Letters. 76 (2006), 4, 690-695.
5. M. Arroyo-Hernández, M. Manso-Silvan, E. López-Elvira, A. Muñoz, A. Climent, J.M. Martínez-Duart. Biosensors and Bioelectronics. En prensa.
6. I. Haller. Journal of the American Chemical Society 100 (1978), 8050-8055.
7. P. Wilkstrom, C.F.Mandenius, P.O.Larsson. Journal of Chromatography 455 (1988), 105-117.
8. L. Pavesi. Rivista del Nuovo Cimento, 20 (1997), 10,1.
9. C. Serre, S. Barret, R. Herino. Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry, 370 (1994), 1-2, 145
10. H. Föll, M. Christophersen, J. Carstensen, G. Hasse. Materials Science and Engineering R 280 (2002), 1-49.
11. S. Lust and C. Lévy-Clément. Physica status solidi (a) 182 (2000) 17.
12. K.D. Jandt. Surface Science 491 (2001) 303-332.
13. "Infrared characteristic group frequencies: tables and charts" G. Socrates. Ed. J. Wiley & Sons, 1994.
14. "Infrared spectroscopy". W.O. George. Ed. J. Wiley & Sons, 1991
15. W.K. Chu, J.W. Mayer, M. A. Nicolet. Backscattering Spectroscopy. Academic Press. New York, 1978.
16. R.J. Composto, R.M. Walters, J. Genzer. Materials Science and Engineering R 38 (2002), 107-180.
17. M. Mayer. SIMNRA User's Guide, IPP report 9/113, Max Plank Institute, 1997.
18. Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy. Ed. Jill Chastain. Perkin-Elmer Corporation, 1992.

19. Analysis of Microelectronic Materials and Devices. Chapter 2.1. Ed. M. Grasserbauer and H.W. Werner. John Willey & Sons Ltd (1991).
20. Current Protocols in Cell Biology. Chapter 4.1. Ed. Juan S. Bonifacino, Mary Dasso et al. John Wiley & Sons, 2006.
21. T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsigi and T. Yamamuro. Journal of Biomedical Materials Research, 24 (1971), 117
22. In Vitro bioactivity of aerosol.gel deposited TiO₂ thin coatings”. R. Viitala, J. Simola, T. Perolta, H. Rahiala, M. Linden, M. Langlet, J.B. Rosenholm. Journal of Biomedical Materials Research, 54 (2001), 109-114.
23. Current Protocols in Molecular Biology. (2004), Sección IV, 2.9.1-2.9.20. Ed. John Wiley & Sons, Inc.

Capítulo 3

*Preparación y caracterización de los
sustratos de silicio poroso.*

3.1. Introducción.

A lo largo de este trabajo de Tesis, se han estudiado diferentes técnicas de biofuncionalización basadas en la deposición de grupos amino. Los materiales que se han empleado como sustratos en los diversos procesos de biofuncionalización son silicio monocristalino y silicio poroso con diferentes tamaños de poro: silicio nanoestructurado (SP_n) y silicio macroporoso (SP_M). En este capítulo, se ha realizado la caracterización de algunas de las propiedades más relevantes de los sustratos de silicio poroso recién fabricados como son la morfología, la topografía, la composición química y la fotoluminiscencia. Esta caracterización previa tiene por objetivo establecer una relación entre las propiedades de los sustratos y la eficiencia de los procesos de funcionalización, así como de las interacciones entre los sustratos y los sistemas biológicos. Por otro lado, los ensayos biológicos realizados en el capítulo 6 requieren una preparación previa de los materiales, tales como la esterilización o los lavados en disoluciones salinas. Puesto que el silicio poroso es un material con una elevada reactividad superficial, es necesario determinar la influencia que estos tratamientos de preparación tienen sobre sus propiedades.

3.2. Propiedades de los sustratos de silicio poroso recién formado.

En este trabajo, se han empleado dos tipos de silicio poroso con tamaños de poro diferentes: silicio nanoestructurado y silicio macroporoso. El silicio nanoestructurado (SP_n) tiene un tamaño de poro comprendido entre 10 y 50 nm y el silicio macroporoso (SP_M) es aquel que tiene poros con un tamaño superior a 50 nm. Como se explicó en el apartado 2.3, ambos tipos de silicio poroso se han obtenido mediante ataque electroquímico de obleas de silicio empleando electrolitos que contienen ácido fluorhídrico (HF) y diversos disolventes. El SP_n se obtuvo empleando electrolitos de HF y etanol (EtOH) y el SP_M empleando electrolitos de HF y dimetilformamida (DMF).

La caracterización de las propiedades del silicio poroso se ha realizado esencialmente sobre los sustratos de SP_n , debido a que los sustratos de SP_M están formados por poros de gran tamaño, separados por una pared muy delgada, lo que les confiere una elevada porosidad. Esto hace que, en la caracterización química mediante

FTIR, la señal que se detecta es básicamente la de la oblea de silicio monocristalino, y en la caracterización por AFM las puntas se dañan dando lugar a imágenes distorsionadas. Además, el SP_M no es nanoestructurado por lo que no presenta fotoluminiscencia. No obstante, el SP_M resulta un sustrato con una morfología de gran interés para la realización de este trabajo debido a que sus poros tienen un tamaño comparable con sistemas biológicos de mayor complejidad y tamaño, como las células, y permiten introducir nuevas variables de estudio como la vascularización de dichos sistemas.

3.2.1. Caracterización morfológica.

Como punto de partida de la caracterización de los sustratos de silicio poroso recién formados, se ha estudiado la morfología de las capas de SP_n resultantes del proceso del ataque electroquímico, mediante SEM y AFM. Las imágenes de SEM, tanto en sección transversal (figura 3.1, A) como en superficie (figura 3.1, B), muestran un material de caras plano-paralelas con una estructura porosa apreciable y una morfología esponjiforme. Las imágenes de SEM en sección transversal permiten medir el espesor de las capas, obteniendo como resultado espesores de $3.5\ \mu\text{m}$ tras 45 segundos de ataque electroquímico y $14.0\ \mu\text{m}$ tras 180 segundos. Estos valores se traducen en una velocidad de ataque de $78\ \text{nm/s}$.

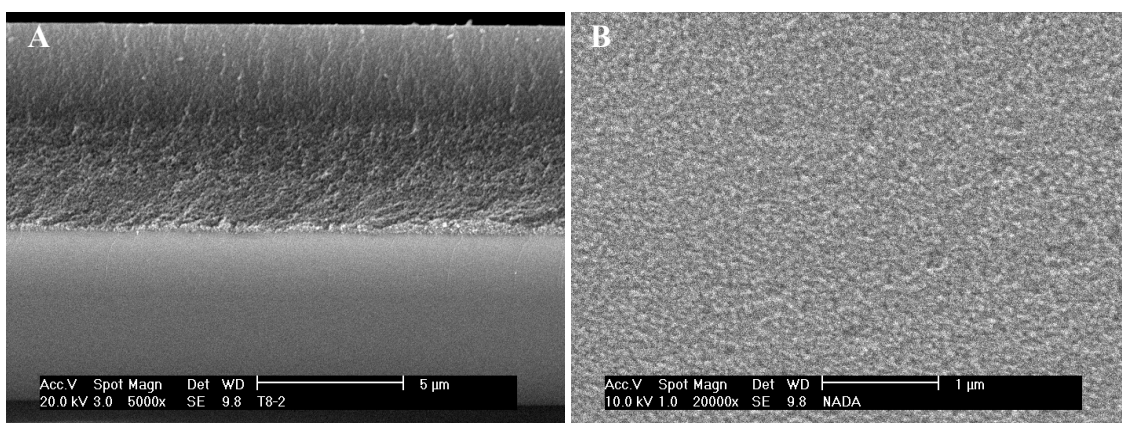


Figura 3.1: Imágenes de SEM en sección transversal (A) y en superficie (B) de una muestra de silicio nanoestructurado obtenida tras un ataque electroquímico de 45 s.

Análogamente, se ha estudiado la morfología y el espesor de las capas de SP_M . Las imágenes de SEM en sección transversal (figura 3.2, A) y en superficie (figura 3.2, B) muestran una estructura porosa con un diámetro medio de los poros de $0.89\ \mu\text{m}$ de

diámetro. Los poros presentan una morfología columnar, como ocurre con el silicio macroporoso obtenido en electrolitos que tienen baja presencia de O y un elevado nivel de H en las intercaras en las que se produce la reacción [1]. Las imágenes de la figura 3.2 corresponden en particular a una muestra obtenida tras 450 s de ataque electroquímico. El espesor resultante es de 2.7 μm , lo que se traduce en una velocidad de ataque de 6.0 nm/s, considerablemente menor que la velocidad de ataque obtenida en SP_n .

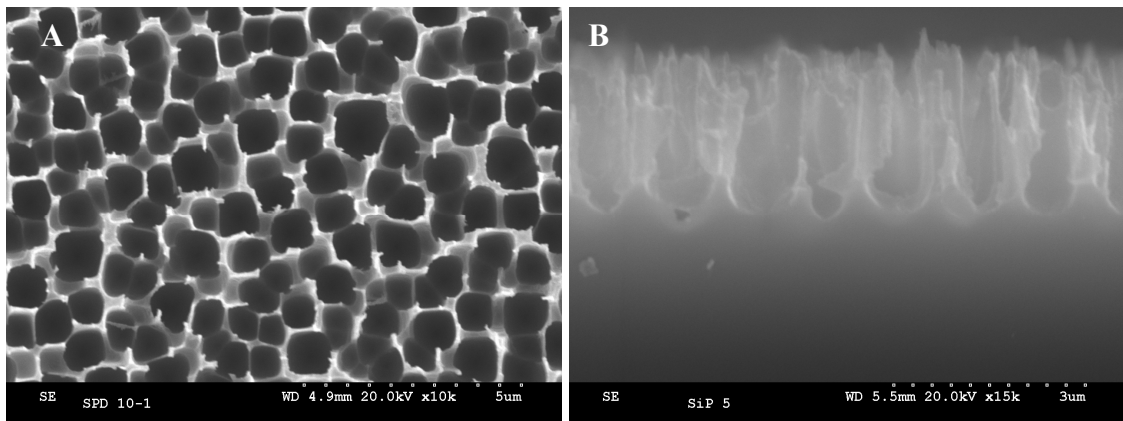


Figura 3.2: Imágenes de SEM en sección transversal (A) y en superficie (B) correspondientes a sustratos de silicio macroporoso tras un ataque electroquímico de 450 s.

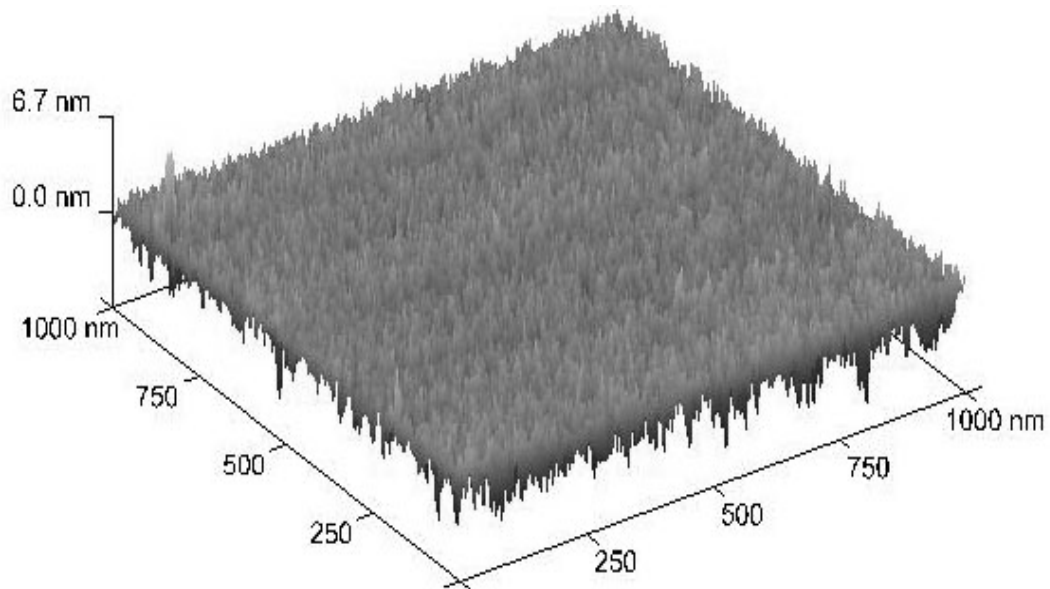


Figura 3.3: Imagen de AFM obtenida en modo contacto intermitente para una muestra de silicio nanoestructurado obtenida tras 180 s de anodización.

Las muestras de SP_M obtenidas presentan una delgada película de SP_n sobre su superficie [2], que se puede eliminar sumergiendo las muestras en KOH durante unos segundos. Dicha capa tiene un espesor de unos pocos nanómetros por lo que no se ha conseguido resolver por SEM.

A continuación, se ha estudiado la topografía de los sustratos de SP_n . La figura 3.3 muestra la imagen obtenida por AFM de un sustrato de silicio nanoestructurado resultante tras 180 s de ataque electroquímico. La superficie de las capas de SP_n tiene una rugosidad $RMS = (0.97 \pm 0.05)$ nm, sensiblemente mayor que la rugosidad de las obleas de silicio monocristalino empleadas para su fabricación, que es $RMS = (0.12 \pm 0.02)$ nm. Este aumento de la rugosidad es consecuencia de la estructura porosa, con poros del tamaño de nanómetros.

3.2.2. Caracterización química.

La composición química de las muestras de silicio poroso recién obtenidas tras el ataque electroquímico se ha estudiado por FTIR y XPS. A continuación se muestran los resultados de la caracterización por FTIR obtenidos para sustratos de SP_n ya que, como se explicó anteriormente, los espectros obtenidos tras el análisis del SP_M corresponden esencialmente con los de las obleas de silicio, debido a la elevada porosidad de las muestras. El espectro de SP_n expresado en términos de absorbancia, tomando como referencia la oblea de silicio correspondiente (apartado 2.4.3), se muestra en la figura 3.4. Las bandas de absorción más importantes que se encuentran en el espectro son las asociadas a enlaces Si-H y Si-Si. Los enlaces Si-H tienen su principal banda de absorción en el rango $2085\text{-}2140\text{ cm}^{-1}$ que corresponde con el modo ν (*stretching*) del triplete formado por las vibraciones SiH (2085 cm^{-1}), a SiH₂ (2115 cm^{-1}) y a SiH₃ (2140 cm^{-1}). Ésta es la banda característica del silicio poroso recién preparado, ya que la superficie presenta una elevada concentración de enlaces Si-H_x ($x = 1\text{-}3$), como resultado del proceso de ataque electroquímico [3]. Otras bandas de absorción correspondientes a este tipo de enlaces y también presentes en el espectro son: SiH₂ (910 cm^{-1}), en el modo δ (*scissor*) y el multiplete en el rango $626\text{-}665\text{ cm}^{-1}$, asociado a distintos modos de vibración del SiH_x.

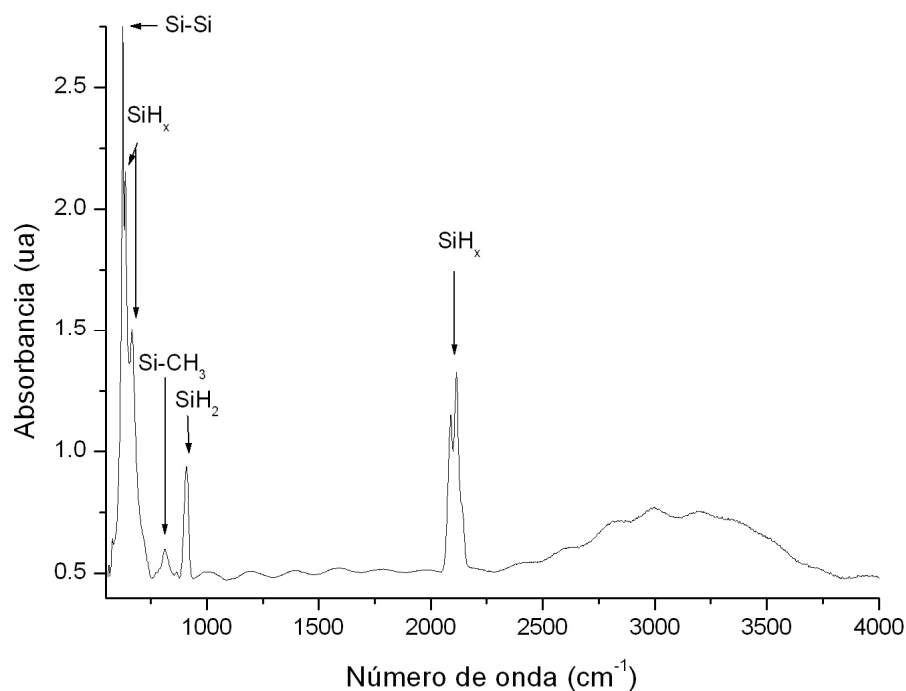


Figura 3.4: Espectro de FTIR de una muestra de silicio nanoestructurado obtenida tras un ataque electroquímico de 180 s.

Además de las bandas de absorción correspondientes a estructuras SiH_x , en el espectro se encuentran otras bandas asociadas a los siguientes grupos: $-\text{OH}$ (alrededor de 3150 cm^{-1}) [4], Si-CH_3 (810 cm^{-1}), procedente de moléculas hidrocarbonadas adsorbidas tras la exposición atmosférica [5,6] y Si-Si (620 cm^{-1}), que es la banda de absorción de mayor intensidad.

La composición química superficial de los sustratos de silicio poroso se ha estudiado por XPS. Como se explicó en el apartado 2.4.5, los espectros se midieron en las muestras en su estado original y tras cinco minutos de bombardeo con iones de argón, para eliminar la contaminación superficial. Los elementos encontrados son Si, O y C. El porcentaje atómico de cada elemento presente en la superficie, sin realizar bombardeo iónico, es 19 % de Si, 36 % de O y 45 % de C, lo que corresponde con una superficie compuesta esencialmente por SiO_2 y carbono. Tras cinco minutos de bombardeo con iones de argón (apartado 2.4.5), el porcentaje atómico de cada elemento es 34 % de Si, 39 % de O y 27 % de C, es decir, se produce una disminución del porcentaje de C como consecuencia del proceso de limpieza de la superficie.

El análisis de los picos de alta resolución correspondientes a cada uno de los elementos anteriores permite obtener información sobre el estado químico en que se encuentra cada uno de ellos. El pico C 1s (figura 3.5) está constituido por dos componentes localizadas en 284.5 y 282.3 eV, correspondientes a C amorfo parcialmente hidrogenado y a enlaces C-Si en forma de SiC [7].

El pico Si 2p (figura 3.6) tiene dos máximos claramente diferenciados. El primero de ellos está centrado a energía de enlace de 99.0 eV y se asocia a estados no oxidados del silicio - Si^0 -, y el segundo, centrado en 103 eV aproximadamente, está asociado al estado oxidado Si^{4+} . La elevada asimetría del conjunto permite distinguir tras el ajuste hasta tres componentes asociadas a diferentes estados de oxidación del silicio. Estas componentes están centradas en 100.6 eV, 102.7 eV y 104.1 eV y corresponderían a los estados Si^{1+} , Si^{3+} y Si^{4+} , respectivamente. Los valores teóricos a los que se sitúan dichos estados se localizarían, de acuerdo con Alexander [8], en 100.5, 102,3 eV, y 103.2, por lo que el pico asociado al SiO_2 se debe encontrar ligeramente desplazado hacia energías mayores respecto de su valor teórico 103.4 eV.

Finalmente, el pico O 1s (figura 3.7) presenta un único máximo en 532.5 eV que se asocia con la presencia de SiO_2 . Sin embargo, este pico presenta una notable anchura, lo que permite descomponerlo en distintas contribuciones, que se pueden atribuir a los subóxidos observados en el pico del Si.

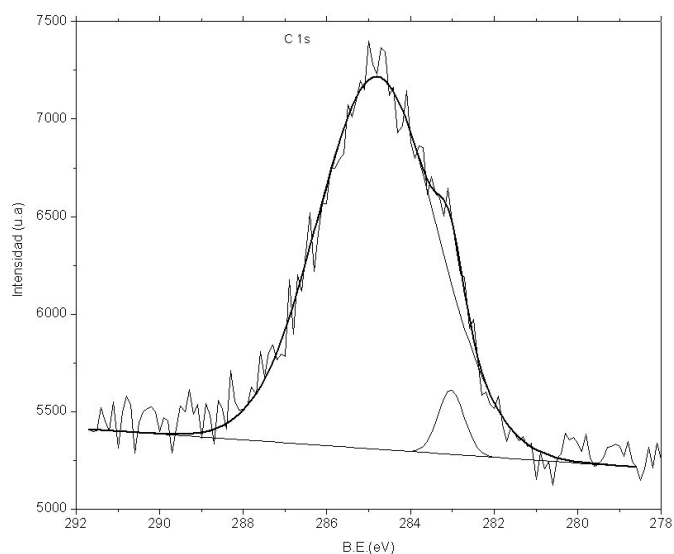


Figura 3.5: Espectro de alta resolución tras 5 minutos de bombardeo iónico del pico C1 s de un sustrato de silicio nanoestructurado.

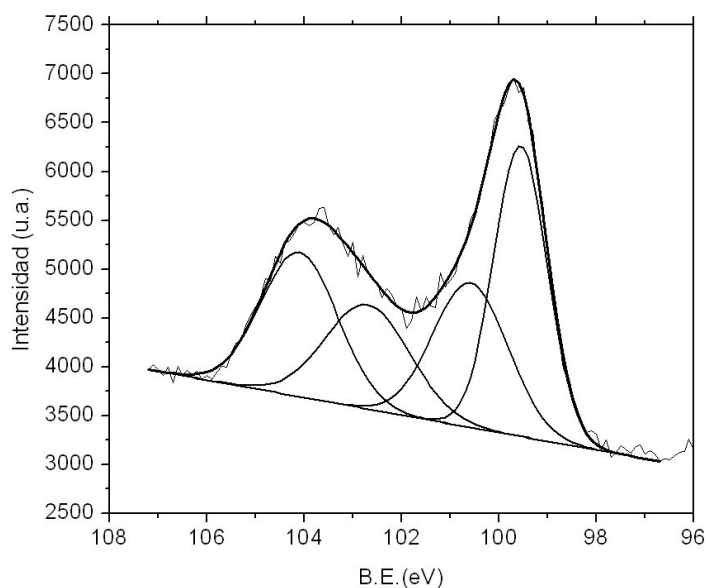


Figura 3.6: Espectro de alta resolución tras 5 minutos de bombardeo iónico del pico Si 2p de un sustrato de silicio nanoestructurado.

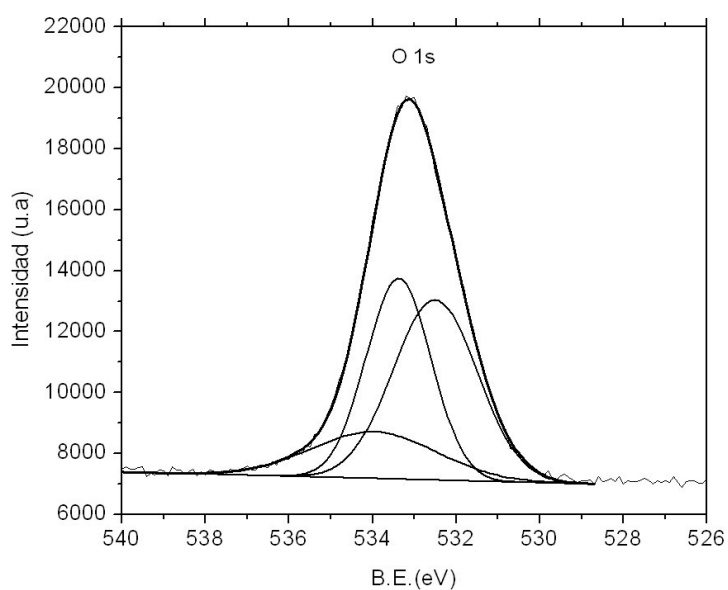


Figura 3.7: Espectro de alta resolución tras 5 minutos de bombardeo iónico del pico O 1s de un sustrato de silicio nanoestructurado.

Como se desprende de los resultados obtenidos por XPS, las capas de silicio poroso están formadas por silicio, tanto en estado no oxidado (nanocristales de silicio), como en diferentes estados de oxidación, incluido el SiO_2 , oxígeno y en menor porcentaje por carbono, en particular C amorfo parcialmente hidrogenado y enlazado al silicio, lo que se corresponde con las estructuras Si-CH_3 observadas en los espectros de FTIR.

3.2.3. Fotoluminiscencia.

El SP_n , al ser nanoestructurado, presenta propiedades características asociadas al tamaño nanométrico de sus cristales, como es una intensa fotoluminiscencia en el visible [9]. En la figura 3.8, se muestra un espectro de fotoluminiscencia característico de una muestra de SP_n , obtenida tras 180 s de ataque electroquímico. Para medir el espectro, se hizo incidir un haz de excitación con una longitud de onda de 400 nm. El máximo de emisión está centrado en 652 nm, o lo que es lo mismo en una energía de 1.9 eV, que corresponde al rango del visible. El espectro presenta una anchura a media altura de 107 nm, que generalmente se relaciona con la distribución del tamaño de los nanocristales que forman el silicio poroso.

Los sustratos de SP_M , por el contrario, no presentan fotoluminiscencia al tratarse de silicio poroso no nanoestructurado.

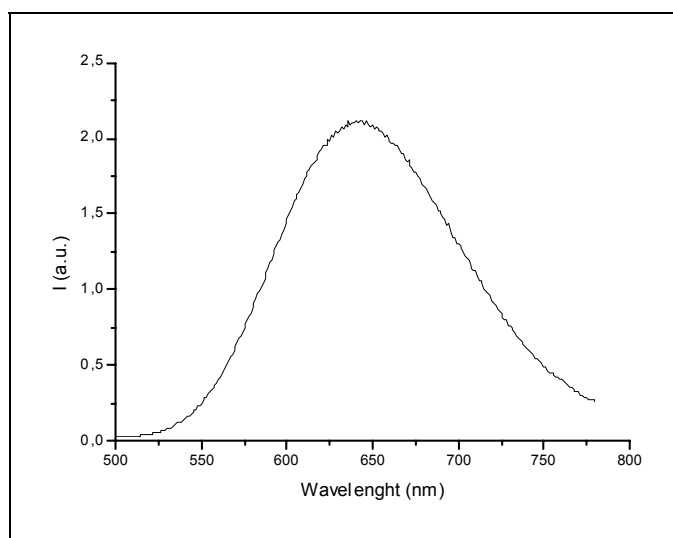


Figura 3.8: Espectro de fotoluminiscencia de una muestra de silicio nanoestructurado obtenida tras 180s de ataque electroquímico.

3.3. Influencia de los tratamientos de preparación para los ensayos biológicos.

El silicio poroso, especialmente el SP_n , tiene una elevada reactividad superficial, por lo que es de gran interés conocer la influencia que tendrán en sus propiedades los diversos tratamientos de esterilización y limpieza, necesarios para su evaluación en los distintos ensayos biológicos realizados en el capítulo 6.

Dos de los métodos más comunes y sencillos para la esterilización de los materiales son la inmersión en etanol (EtOH) y la irradiación con luz ultravioleta (UV). Como se explicó en el capítulo 1, la luz UV transforma los grupos amino (NH_2), que son los grupos depositados mediante las diversas técnicas de funcionalización, en grupos hidroxilo (OH), por lo que a lo largo de este trabajo, se ha empleado el EtOH como método de esterilización. Por otra parte, la limpieza de los sustratos en los ensayos biológicos se ha realizado empleando una solución salina con tampón de fosfato (PBS, apartado 2.4.6). Para estudiar cómo afectan estos tratamientos de esterilización y limpieza a las propiedades del SP_n , los sustratos se han sumergido en EtOH y PBS durante un periodo de 432 horas, y se ha evaluado la variación de la composición superficial y de la fotoluminiscencia a lo largo de dicho intervalo, tomando como referencia la variación experimentada por sustratos de SP_n expuestos a la atmósfera y por sustratos conservados en una cámara seca. A partir de los espectros de FTIR se ha estudiado la evolución de la banda de absorción situada alrededor de 2100 cm^{-1} , correspondiente a los enlaces SiH_x . Se ha escogido esta banda porque el fondo es muy plano en la zona del espectro en la que aparece y porque su análisis permite conocer simultáneamente el comportamiento de los tres tipos de enlace SiH_x : SiH , SiH_2 y SiH_3 . Los resultados obtenidos para los grupos SiH_2 en esta banda se han comparado con los resultados obtenidos para los mismos grupos en la banda centrada en 906 cm^{-1} , observándose el mismo comportamiento. Otras bandas relevantes son las asociadas a la aparición de óxidos: enlaces SiH tras oxidar, cuya banda asociada aparece en 2250 cm^{-1} , óxido de silicio, cuya banda aparece en 1070 cm^{-1} y las bandas asociadas a la formación de grupos hidroxilo OH, que aparecen alrededor de 3650 cm^{-1} y en el rango $850\text{-}910\text{ cm}^{-1}$. En los espectros de fotoluminiscencia se ha evaluado la variación de la intensidad y la posición del máximo de emisión, así como la de la anchura a media altura.

Para estudiar la evolución de las propiedades de los sustratos de SP_n conservados en las condiciones anteriores, los espectros de FTIR y fotoluminiscencia de los distintos sustratos se han medido en los siguientes intervalos: 3, 24, 48, 72, 144 y 432 horas. El SP_n empleado en este estudio se ha obtenido tras 180 s de ataque electroquímico.

3.3.1. Composición química.

La evolución con el tiempo de los espectros de infrarrojo correspondientes a los sustratos de SP_n conservados en los distintos ambientes se muestra en las figuras 3.9-

3.12. En todos los casos, los espectros están referenciados a la oblea de silicio monocristalino correspondiente.

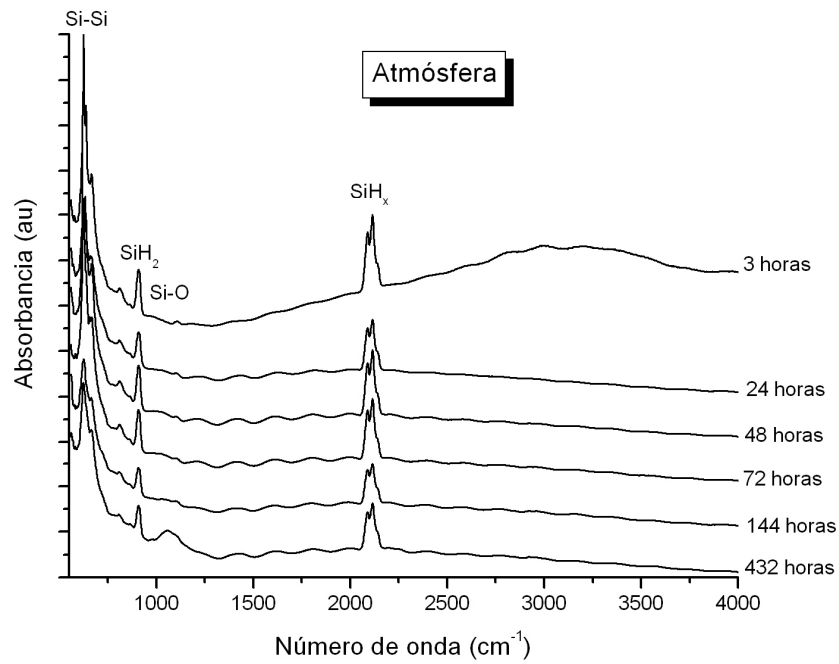


Figura 3.9: Evolución temporal de los espectros FTIR de las muestras silicio nanoestructurado expuestas a la atmósfera.

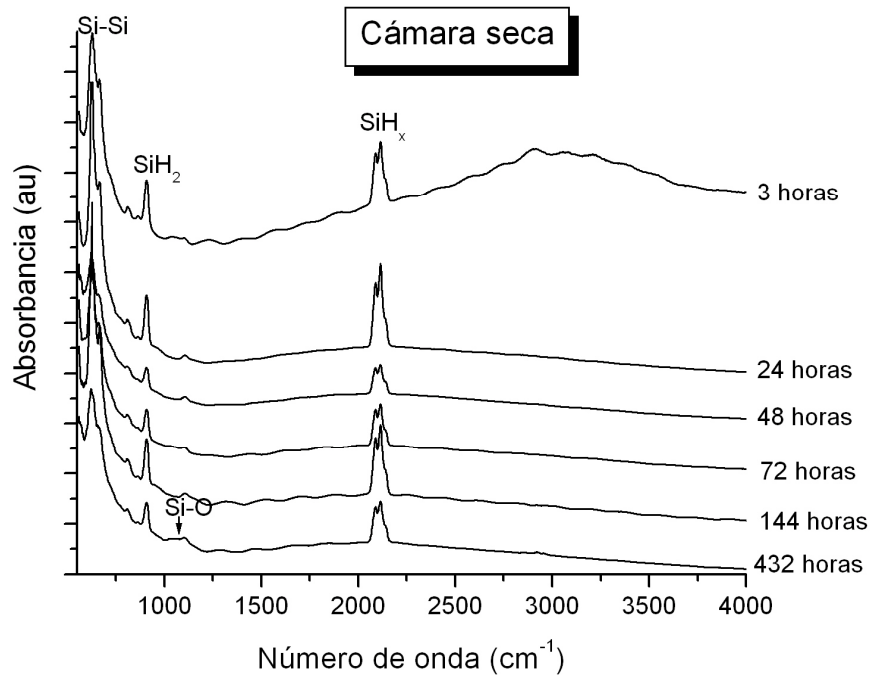


Figura 3.10: Evolución temporal de los espectros FTIR de las muestras silicio nanoestructurado conservadas en cámara seca.

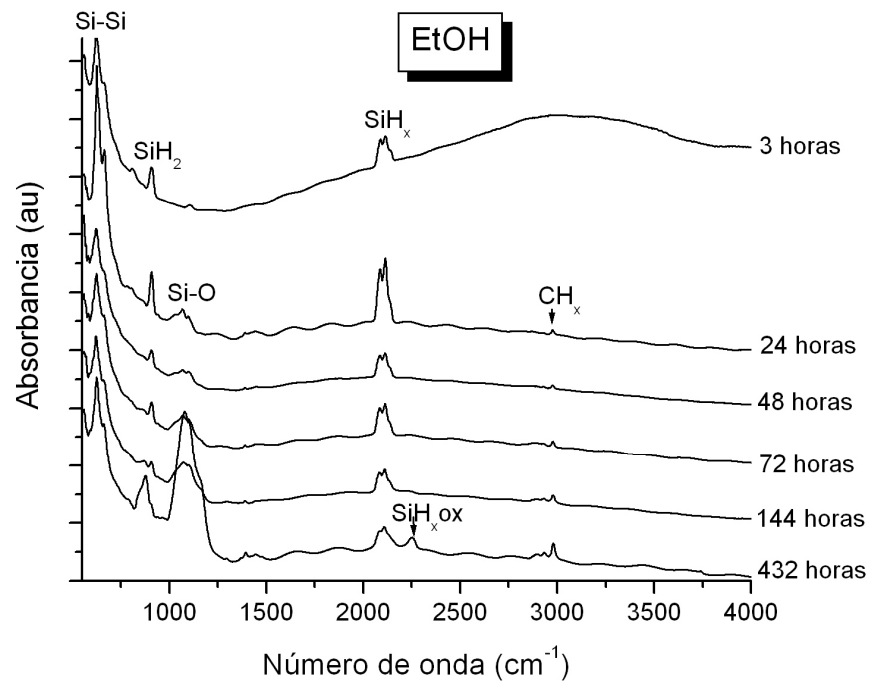


Figura 3.11: Evolución temporal de los espectros FTIR de las muestras silicio nanoestructurado conservadas en EtOH.

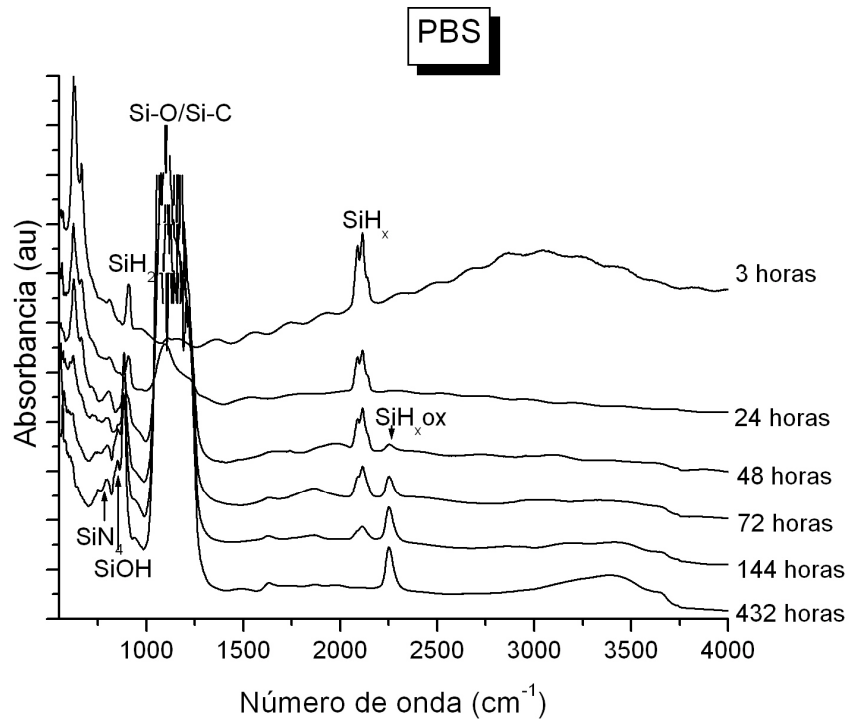


Figura 3.12: Evolución temporal de los espectros FTIR de las muestras silicio nanoestructurado conservadas en PBS.

En los cuatro casos, es decir, SP_n expuesto a la atmósfera (figura 3.9), conservado en cámara seca (figura 3.10), en EtOH (figura 3.11) y en PBS (figura 3.12), la banda de absorción correspondiente a enlaces SiH_x disminuye con el paso del tiempo, como se observa en la figura 3.13, en la que se muestra la evolución temporal del área bajo la curva asociada a la banda de absorción de dichos enlaces (2100 cm^{-1}). Sin embargo, mientras que la variación producida en los tres primeros casos es de entre el 62 y el 67 % del valor inicial transcurridas 432 horas, la disminución producida en los sustratos conservados en PBS es mucho más acusada, siendo un 60% del valor inicial transcurridas las primeras 24 horas y llegando a ser tan sólo un 1% del valor inicial al cabo de 432 horas. Es interesante destacar que estas últimas muestras son las que sufren mayor oxidación, como se verá a continuación.

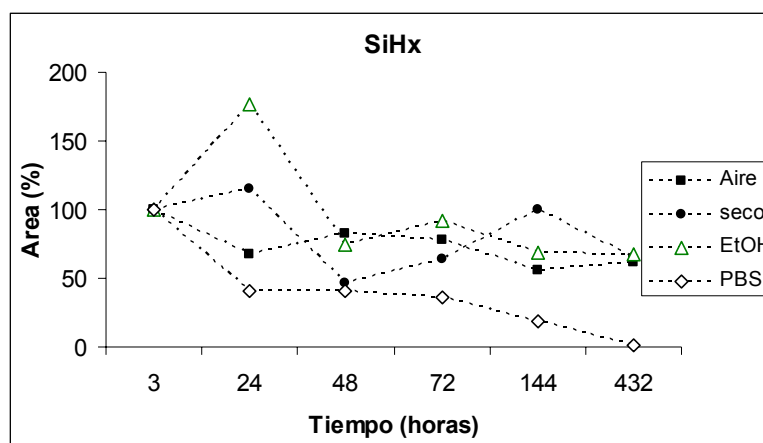


Figura 3.13: Evolución temporal de los enlaces SiH_x para las muestras de silicio nanoestructurado conservadas en diferentes atmósferas.

La aparición de nuevas componentes a lo largo del tiempo es distinta en los diferentes casos. En las muestras de referencia, es decir, las muestras expuestas a la atmósfera y las conservadas en cámara seca, se mantienen las mismas contribuciones que las obtenidas en el espectro inicial. Tan sólo tras 432 horas aparece una componente asociada a óxidos de silicio, aunque con una intensidad casi despreciable. En particular, para las muestras conservadas en aire (figura 3.9), dicha banda de absorción está centrada en 1060 cm^{-1} , con un área total bajo la curva, de 40 unidades arbitrarias (ua), y se puede descomponer en dos contribuciones, 1035 cm^{-1} y 1070 cm^{-1} , que corresponden a Si-O en estructuras del tipo Si-O-Si y a SiO_2 , respectivamente. En las muestras conservadas en cámara seca (figura 3.10), el área total bajo la curva es 9 ua, bastante menor que en las muestras conservadas en aire, como cabía esperar al estar menos

expuestas a vapor de agua, y la contribución tiene tres componentes: 1022 cm^{-1} (Si-O-Si), 1070 cm^{-1} (SiO₂) y en 1108 cm^{-1} (Si-O-C).

En las muestras conservadas en EtOH (figura 3.11) la banda asociada a enlaces Si-O (centrada en 1100 cm^{-1}) aparece trascurridas tan sólo 24 horas. Como en el caso de los sustratos conservados en la cámara seca, dicha banda se puede descomponer en tres contribuciones: 1033 cm^{-1} (Si-O-Si), 1069 cm^{-1} (SiO₂) y 1103 cm^{-1} (Si-O-C). Tras 72 horas aparecen bandas de absorción correspondientes a enlaces SiH tras oxidar (2250 cm^{-1}) y a CH_x de cadenas hidrocarbonadas procedentes del EtOH (2920 cm^{-1}). La tabla 3.1 muestra la evolución del área bajo la curva asociada a cada una de estas contribuciones. La banda asociada a la oxidación del silicio aumenta a lo largo del tiempo, siendo al final del estudio casi 6 veces mayor que la banda de las muestras expuestas a la atmósfera. El área bajo la curva correspondiente a la banda de absorción de las cadenas hidrocarbonadas es prácticamente despreciable frente a la anterior.

A (ua)	3 h	24 h	48 h	72 h	144 h	432 h
SiO	-	23	15	27	66	224
SiH tras oxidar	-	-	-	-	-	4
CHx	-	0,6	0,5	3	5	5

Tabla 3.1: Evolución temporal del área bajo la curva de las bandas de absorción de FTIR de los sustratos de silicio nanoestructurado conservados en EtOH.

Finalmente, las muestras sumergidas en PBS (figura 3.12) presentan la banda de absorción correspondiente a la oxidación del silicio de mayor intensidad. De hecho, el grado de oxidación de los sustratos sumergidos en PBS durante 48 horas es superior al experimentado por los sustratos sumergidos en EtOH a lo largo de las 432 horas del estudio. La contribución asociada a SiH tras oxidar (2250 cm^{-1}) aparece transcurridas tan sólo 24 horas y además surgen nuevas bandas de absorción correspondientes a SiOH y SiCH₃. La evolución de los picos y de las áreas, se muestran en la tabla 3.2.

Área (ua)	3 h	24 h	48 h	72 h	144 h	432 h
SiO	-	75	502	651	711	766
SiH tras oxidar	-	-	3	9	14	19
SiOH(887)	-	-	10	16	19	29
SiCH ₃ (857)	-	-	1	93	109	42

Tabla 3.2: Evolución temporal del área bajo la curva de las bandas de absorción de FTIR de los sustratos de silicio nanoestructurado conservados en PBS.

Por lo tanto, la esterilización con EtOH y los lavados con PBS modifican la composición química de los sustratos de silicio poroso respecto a los que han sido expuestos a la atmósfera y conservados en cámara seca. Dicha modificación se traduce en una mayor oxidación así como en la aparición de nuevas componentes: CH_x , en el caso de los sustratos sumergidos en EtOH, y de las componentes SiOH y SiCH_3 , en los sustratos sumergidos en PBS. No obstante, la variación que se produce en los sustratos sumergidos en EtOH es comparable a la de los sustratos de referencia dentro de las primeras 24 horas. En el caso de los sustratos sumergidos en PBS, es interesante destacar que se forman estructuras SiOH, cuando el porcentaje de SiH_x es todavía significativo. En particular, la contribución asociada a grupos OH es bastante relevante tras 48 horas, conservando el 50 % de las estructuras SiH_x presentes, efecto interesante para la funcionalización por silanización [10].

3.3.2. Fotoluminiscencia.

La evolución temporal de los espectros de fotoluminiscencia correspondientes a los sustratos de SP_n expuestos a la atmósfera y conservados en cámara seca y en EtOH es muy similar, mientras que los espectros correspondientes a los sustratos conservados en PBS presentan mayores diferencias. La figura 3.14 muestra la evolución temporal de los espectros de fotoluminiscencia obtenidos para los sustratos conservados en EtOH (A) y PBS (B). La intensidad de fotoluminiscencia disminuye con el tiempo y la posición del máximo varía ligeramente en los espectros correspondientes a los sustratos conservados en EtOH, mientras que en los conservados en PBS, la emisión inicial desaparece tras 24 horas y aparece un nuevo máximo a longitud de onda menor. La variación de la intensidad con el tiempo se muestra en la figura 3.15 para los cuatro casos estudiados.

En los sustratos de referencia (atmósfera y cámara seca) y en los sustratos sumergidos en EtOH, se observa una disminución de la intensidad del pico de fotoluminiscencia con el tiempo. La disminución de la intensidad en las muestras expuestas al aire y en cámara seca es del 64% en las primeras 24 horas y del 30% transcurridas 432 horas. La disminución de la intensidad observada en los sustratos sumergidos en EtOH es comparable a la observada en los sustratos de referencia en las primeras 24 horas, aunque es bastante más acusada a partir de 72 horas, siendo la intensidad tan sólo un 9 % de la inicial transcurridas las 432 horas del estudio. Por el

contrario, la intensidad del máximo de fotoluminiscencia registrada para los sustratos de SP_n conservados en PBS muestra una importante disminución en las primeras 24 horas mientras que en las sucesivas se produce un ligero aumento de la intensidad, como consecuencia de la aparición de una nueva banda de fotoluminiscencia centrada en 498 nm.

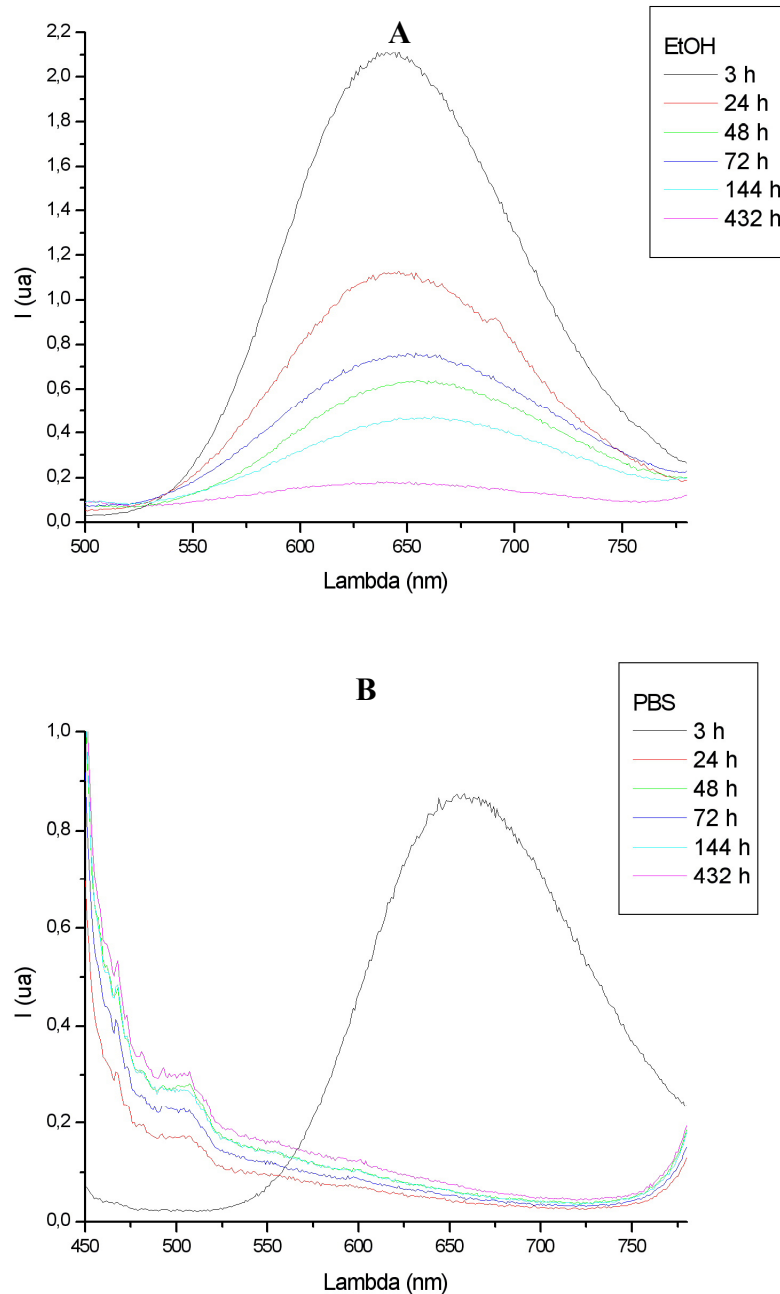


Figura 3.14: Evolución temporal de los espectros de fotoluminiscencia correspondientes a sustratos de silicio nanoestructurado expuestos a EtOH (A) y PBS (B).

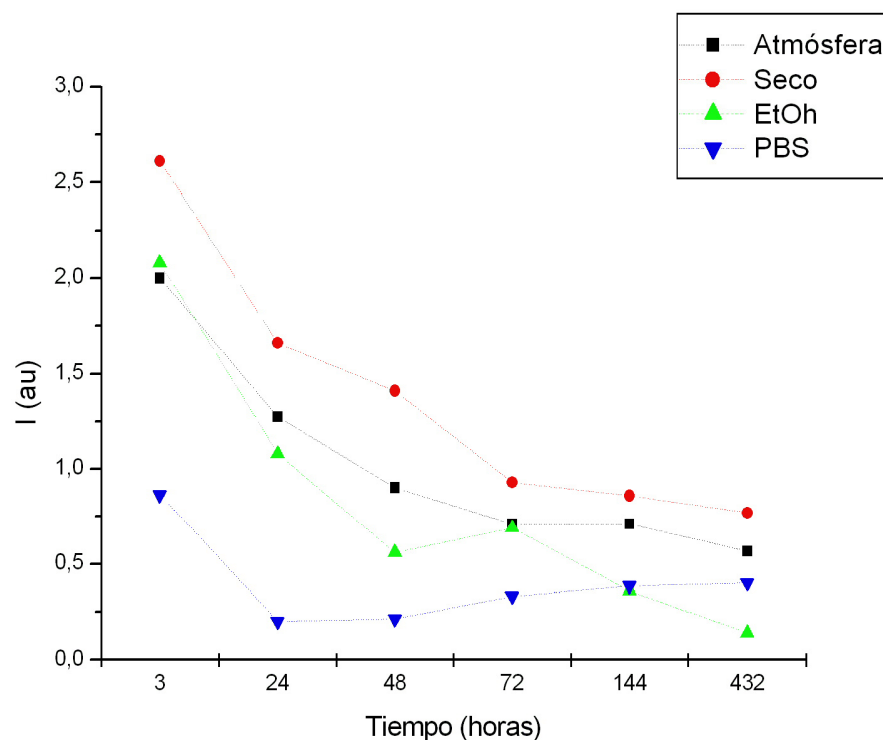


Figura 3.15: Evolución temporal de la intensidad de emisión de fotoluminiscencia de los sustratos de silicio nanoestructurado expuestos a la atmósfera, conservados en cámara seca, en EtOH y en PBS.

La figura 3.16 muestra la evolución temporal de la posición del máximo de fotoluminiscencia. Los sustratos expuestos a EtOH y los conservados en la cámara seca presentan un comportamiento similar, manteniéndose la posición del máximo de fotoluminiscencia prácticamente constante alrededor de 652 nm (1.9 eV). En ambos casos, la anchura a media altura aumenta desde 97 nm hasta 119 nm, es decir, aumenta la dispersión del tamaño de los nanocristales como consecuencia de la oxidación que sufren. Sin embargo, en las muestras expuestas al aire la posición del máximo disminuye ligeramente, desde 700 nm (1.8 eV) a 622 nm (2.0 eV).

Los espectros correspondientes a las muestras conservadas en PBS presentan un desplazamiento del máximo de fotoluminiscencia desde 652 nm (1.9 eV) hasta 497 nm (2.5 eV), en tan sólo 24 horas, una intensidad creciente con el tiempo de inmersión en PBS y una anchura a media altura de 60 nm frente a los 100 nm que presenta inicialmente. Todo esto se debe a que tras un sólo día de inmersión en PBS, la fotoluminiscencia en el visible desaparece y comienza a observarse una nueva banda de emisión, cercana al ultra-violeta. Esta banda, llamada banda de fotoluminiscencia en el

azul-verde, se observa en muestras que han sido expuestas a algún tipo de tratamiento de oxidación. Aunque el origen de esta banda es aún fuente de controversia, una de las teorías propuestas es la presencia de grupos silanoles, como centros responsables de la emisión en azul [11, 12]. Es interesante destacar que los espectros de FTIR mostraban la formación de grupos SiOH solamente en las muestras sumergidas en PBS (figura 3.12) y que el área bajo la curva correspondiente aumenta con el tiempo de conservación en PBS, del mismo modo que la intensidad de fotoluminiscencia. Esta banda de emisión en el azul, está asociada a desexcitaciones del orden de los nanosegundos, por lo que su estudio es interesante para aplicaciones en *displays* y dispositivos optoelectrónicos de alta velocidad. Sin embargo, la relevancia de este comportamiento en relación a los estudios realizados en este trabajo, es que la emisión de fotoluminiscencia en el azul-verde coincide con la emisión de fluorescencia del isotiocianato de fluoresceína (FITC, apartado 2.4.6), el fluoróforo que se ha empleado de forma sistemática en este trabajo para evaluar la reactividad de los grupos amino superficiales y cuyo máximo de emisión está en 510 nm. Este fenómeno puede falsear las imágenes de fluorescencia, al dar como resultado emisión que proviene de la fotoluminiscencia del SP_n en lugar de la fluorescencia de la FITC.

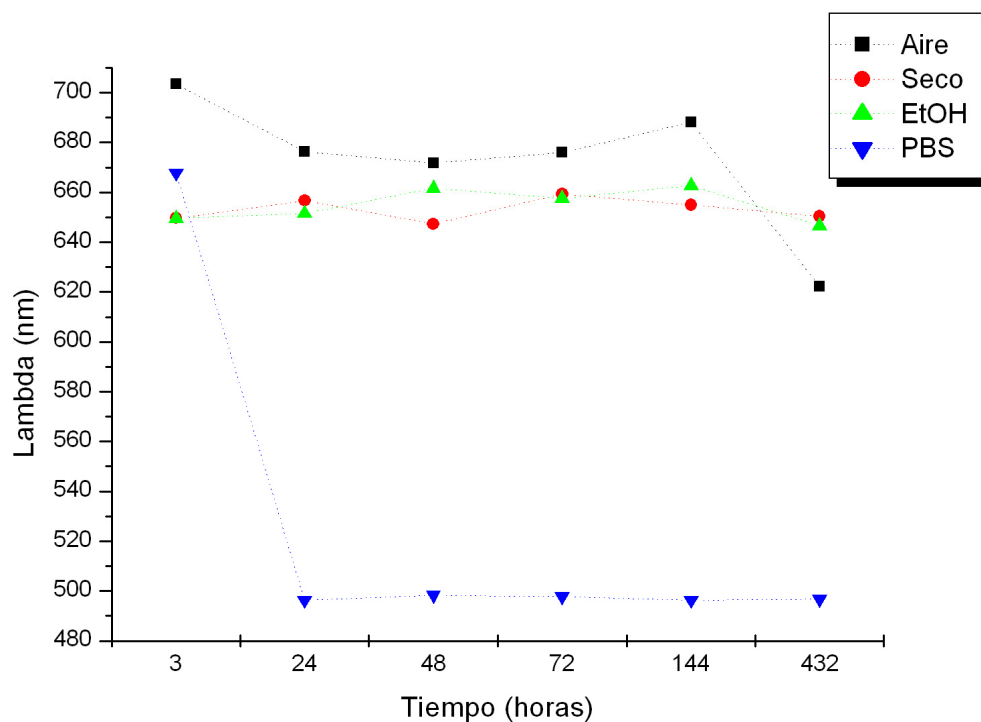


Figura 3.16: Evolución temporal de la posición del máximo de fotoluminiscencia de los sustratos de silicio nanoestructurado conservados en distintos medios.

Para evaluar la posible interferencia de la banda de fotoluminiscencia centrada en 498 nm con las observaciones realizadas mediante el microscopio de fluorescencia (apartado 2.4.6) se ha realizado el siguiente estudio: por un lado, sustratos de SP_n recién fabricados se han sumergido en PBS durante 24, 96 y 216 horas. De forma paralela, sustratos de SP_n expuestos a la atmósfera durante los mismos tiempos (24, 96 y 216 horas), se han sumergido a continuación en PBS durante 1 día. En todos ellos, se ha estudiado la emisión en el verde-azul empleando el microscopio de fluorescencia, con las siguientes condiciones de medida: escala de verde (25-100) y tiempo de exposición 2 segundos. En la figura 3.17 se muestra la emisión recogida para un sustrato de SP_n sumergido en PBS, inmediatamente después de su formación, durante 24 horas. En efecto, las imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia recogen una emisión análoga a la que cabría esperar en sustratos a los que se hubieran enlazado moléculas de FITC previamente.

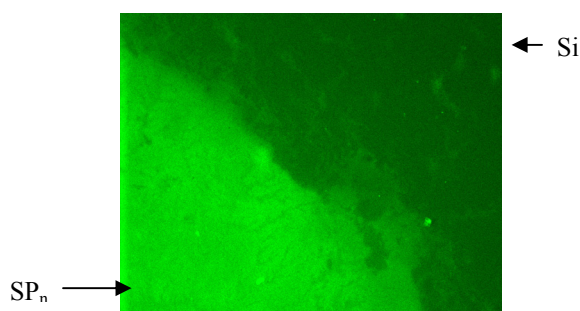


Figura 3.17: Imagen de fluorescencia correspondiente a una muestra de silicio nanoestructurado sumergida en PBS durante 24 horas inmediatamente después del ataque electroquímico.

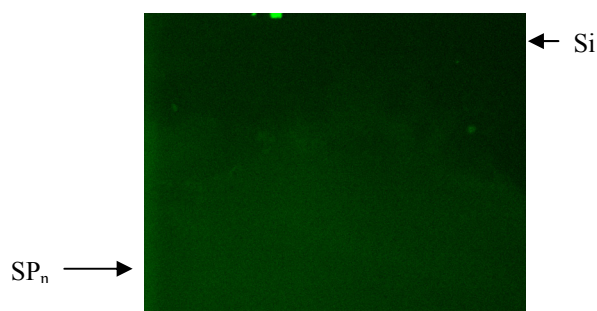


Figura 3.18: Imagen de fluorescencia correspondiente a una muestra de silicio nanoestructurado envejecida durante 6 días sumergida en PBS durante un día.

Al aumentar el tiempo de inmersión en PBS a 24, 96 y 216 horas, las imágenes de fluorescencia muestran una emisión creciente, de acuerdo con el comportamiento de

la intensidad de fotoluminiscencia observada anteriormente (figuras 3.14B y 3.15). Este aumento se explica a su vez por el aumento de silanoles observado por FTIR (tabla 3.6). Por el contrario, los sustratos de SP_n que se sumergieron en PBS varios días después de haber sido preparados no muestran emisión en el verde (figura 3.18).

Como consecuencia de las observaciones anteriores se deduce que para el empleo de sustratos de SP_n en ensayos que requieran la inmersión en PBS durante un cierto tiempo y la posterior detección por fluorescencia empleando FITC, se ha de tomar la precaución de dejarlos expuestos a la atmósfera, como mínimo 24 horas, antes de sumergirlos en PBS o bien, emplear protocolos específicos para la eliminación de la autofluorescencia de los materiales (ver sección 2.3.6).

3.4. Sumario.

A lo largo de este capítulo se ha realizado la caracterización de los sustratos de silicio poroso recién fabricados y se ha estudiado la influencia que los tratamientos de limpieza y esterilización tienen en sus propiedades. Todo ello, permitirá establecer relaciones entre las propiedades de los sustratos y su comportamiento en los ensayos biológicos que se realizarán en el capítulo 6.

Mediante ataque electroquímico empleando electrolitos de HF se ha obtenido silicio poroso con dos tamaños de poro bien diferenciados: silicio nanoestructurado, con poros menores a 50 nm, a partir de electrolitos de ácido fluorhídrico y etanol, y silicio macroporoso, con poros del orden de 0.9 micras, empleando electrolitos de ácido fluorhídrico y dimetilformamida. Los sustratos de silicio nanoestructurado recién formado están compuestos por Si y O, en diversos estados de oxidación y por una cierta contaminación de C, procedente del ambiente. Las bandas de absorción obtenidas en los espectros de FTIR son las asociadas esencialmente a las estructuras SiH_x . El silicio nanoestructurado presenta, como consecuencia de su nanoestructura, una banda de fotoluminiscencia con un máximo de emisión centrado en 652 nm (1.9 eV), es decir, en el rango visible, y con una anchura a media altura de 107 nm.

Los tratamientos de esterilización en etanol y de lavado en buffer salino de fosfato aplicados a los sustratos de silicio poroso, modifican tanto su composición

química como su fotoluminiscencia. El método de esterilización, basado en sumergir las muestras en etanol, produce en las primeras 24 horas modificaciones comparables a las sufridas por los sustratos de silicio nanoestructurado expuestos a la atmósfera o conservados en cámara seca. La intensidad de fotoluminiscencia disminuye a un 54% en las primeras 24 horas, valor comparable con la disminución observada en los sustratos de referencia, es decir, expuestos a la atmósfera y conservados en cámara seca. La posición del máximo de emisión permanece prácticamente constante a lo largo de todo el estudio. Por tanto, este método se empleará como método de esterilización de los materiales para su empleo en diversos ensayos biológicos.

La influencia del buffer salino (PBS) sobre el silicio poroso es bastante más acusada, tanto en la composición química como en la fotoluminiscencia. Respecto a la variación de la composición química, en las primeras 24 horas la contribución asociada a los grupos SiH_x disminuye en más de un 50% y la contribución de óxido de silicio es el triple de la observada en etanol tras las 432 horas que dura el estudio. A partir de 48 horas, aparecen nuevas contribuciones asociadas a óxidos de silicio y silanoles. Esta variación en la composición química producida como consecuencia de la inmersión en PBS permite obtener de forma muy sencilla una elevada presencia de grupos OH tras 48 horas, conservando aún el 50 % de las estructuras SiH_x presentes, lo que es de interés en los métodos de funcionalización por silanización. En cuanto a la fotoluminiscencia, en tan sólo 24 horas desaparece la emisión inicial en el visible, cuyo máximo estaba centrado en 652 nm (1.9 eV), para dar paso a otra banda de emisión cercana al ultravioleta, centrada en 497 nm (2.5 eV). Esta nueva banda de fotoluminiscencia, de intensidad creciente con el tiempo de inmersión, podría ser de interés en el desarrollo de biosensores de silicio poroso basados en la fotoluminiscencia. Sin embargo, la banda en el azul-verde lleva a tener ciertas precauciones a la hora de emplear el silicio poroso que ha sido sumergido en PBS en aplicaciones que requieran la detección por microscopía de fluorescencia. Dichas precauciones consisten en dejar que transcurran al menos 24 horas desde la fabricación del silicio poroso hasta su inmersión en PBS, lo que evita la aparición de la banda en el ultravioleta cercano, o bien en emplear protocolos para eliminar la autofluorescencia de los materiales.

3.5. Bibliografía.

1. M. Christophersen, J. Carstensen, A. Feuerhake and H. Föll. Materials science and engineering B 69-70 (2000) 194-198.
2. S. Lust and C. Lévy-Clément. Physica status solidi (a) 182 (2000) 17.
3. A. Venkateswara, F.Ozanam, J.N.Chazalviel. Journal of Electrochemistry Society 138 (1991), 153.
4. T. Konishi, T.Yao, M.Tajima, H. Ohshima, H. Ito, T. Hattori. Jpn. Journal of Applied Physics, 31 (1992) L1216.
5. A. Borghesi, A. Sassella, B. Pivac, L. Pavesi. Solid State Communications 87 (1993) 1, 1-4.
6. L.T. Canham, M.R. Houlton, W.Y. Leong, C. Pickering and J.M. Keen. Journal of Applied Physics 70 (1991), 1 422-431.
7. B. A. Angelis, C. Rizzo, C. Contarini, S. P. Howlett. Applied Surface Science 51 (1991) 177-183.
8. M. R.Alexander, R.D. Short, F.R. Jones, W. Michaeli, C. J Blomfield. Applied Surface Science 137 (1999) 179-183.
9. A.G.Cullis, L.T.Canham, P.D.J.Calcott. Journal of Applied Physics 82 (1997) 3, 909-965.
10. D.S. Xu, L Sun, H.L. Li, L. Zhang, G.L. Guo, X.S. Zhao, L.L .Gui. New Journal of Chemistry 27 (2003), 2, 300-306.
11. H. Tamura, M. Rückschloss, T. Wirschem and S.Veprek, Thin Solid Films 255 (1995), 92-95.
12. Y.Kanemitsu, H.Uto, Y. Masumoto, T. Futagi, T. Matsumoto and H. Mimura, Physics Review B 48 (1993), 2827.

Capítulo 4

Biofuncionalización por inmersión.

4.1. Introducción.

En el capítulo anterior se realizó la caracterización de algunas de las propiedades más importantes de los sustratos de silicio poroso así como el estudio de la influencia que los tratamientos de esterilización y limpieza tienen en dichas propiedades. Una vez caracterizados los sustratos, se procede al análisis de las distintas técnicas de biofuncionalización que se han empleado, basadas todas ellas en la deposición de grupos amino.

En este capítulo, se recogen los resultados obtenidos mediante la técnica de inmersión en disoluciones de APTS en tolueno, siguiendo el procedimiento detallado en el apartado 2.2.1. Como se explicó en el capítulo 1, la técnica de inmersión es una técnica de silanización de uso estándar con 3-aminopropiltrietoxisilano (APTS), por lo que está ampliamente documentada en la bibliografía. Por este motivo y por la gran sencillez y rapidez con la que se pone en práctica, esta técnica ha sido escogida como técnica de referencia para evaluar la eficacia de los métodos de deposición química en fase vapor que se han desarrollado en esta Tesis. Conviene recordar que al ser una técnica de silanización, se basa en la hidrólisis y la condensación del APTS sobre superficies ricas en grupos $-OH$ y, por tanto, es fuertemente dependiente de la química superficial de los sustratos [1].

En este estudio se muestran los resultados obtenidos al funcionalizar sustratos de silicio monocristalino, nanoestructurado y macroporoso. Como en el capítulo anterior, en primer lugar se ha realizado la caracterización de la superficie de los distintos sustratos una vez funcionalizados, mediante SEM y AFM, y a continuación se ha estudiado su composición química mediante FTIR y XPS. Además de lo anterior, la caracterización de los sustratos funcionalizados requiere evaluar las propiedades relacionadas con la reactividad superficial de las capas obtenidas tras el proceso. Dicha reactividad depende no sólo de la concentración de grupos funcionales sobre la superficie (que se puede determinar mediante análisis químicos, como XPS) sino también de la accesibilidad que los grupos funcionales presentan a las biomoléculas. De acuerdo con esto, las propiedades asociadas a la reactividad superficial se han evaluado empleado técnicas específicas como la microscopía de fluorescencia y la absorbancia en

el UV, basadas en la reacción de los grupos amino funcionales con isotiocianato de fluoresceína (apartado 2.4.6) o con nitrobenzaldehído (apartado 2.4.7), respectivamente.

A lo largo del estudio, los sustratos se han funcionalizado empleando disoluciones que contienen 1% de APTS en tolueno y se ha estudiado la influencia del tiempo de inmersión y de la temperatura de la disolución durante el proceso. Por último, se han comparado los resultados obtenidos sobre los distintos tipos de sustratos empleados: silicio monocristalino, nanoestructurado y macroporoso.

4.2. Caracterización morfológica.

Como punto de partida, se ha analizado la morfología de los depósitos obtenidos al funcionalizar por inmersión **sustratos de silicio monocristalino**. Las imágenes de SEM muestran, en todos los casos estudiados, la formación sobre la superficie de aglomerados coloidales. Como se explicó en el capítulo 1, los procesos de funcionalización por inmersión dan como resultado la formación de monocapas de oligómeros de APTS sobre las que se depositan este tipo de estructuras, formadas como consecuencia de la polimerización de las moléculas de APTS entre sí [2]. La figura 4.1 muestra un detalle de estas estructuras, obtenidas sobre silicio monocristalino tras 30 minutos de inmersión a temperatura ambiente. En ella se observa que los coloides tienen tamaños comprendidos entre 50 y 110 nm.

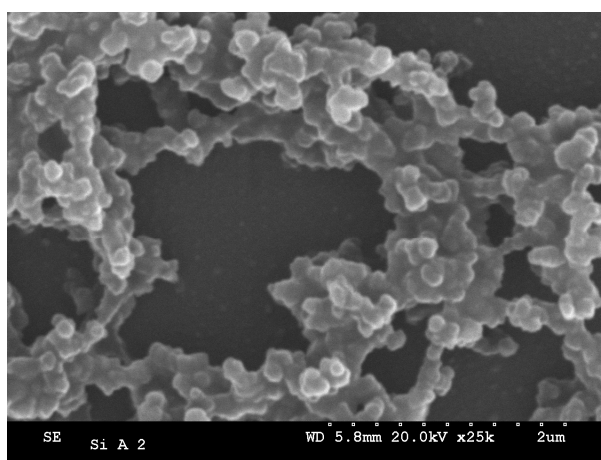


Figura 4.1: Detalle de las estructuras formadas como consecuencia de la polimerización de APTS sobre un sustrato de silicio monocristalino.

Si se estudia la influencia del tiempo de inmersión a temperatura ambiente, se observa que su aumento se traduce en un mayor porcentaje de superficie recubierta por estas estructuras coloidales. La figura 4.2 muestra una secuencia de imágenes de SEM correspondientes a sustratos de silicio monocristalino funcionalizados durante 10, 30, 60 y 420 minutos, respectivamente. Mientras que las muestras funcionalizadas durante 10 minutos presentan la formación de pequeños aglomerados de coloides distribuidos aleatoriamente sobre la superficie, según aumenta el tiempo de inmersión, aumenta el número y tamaño de las estructuras coloidales, llegando a recubrir casi completamente la superficie en el caso de 420 minutos de inmersión.

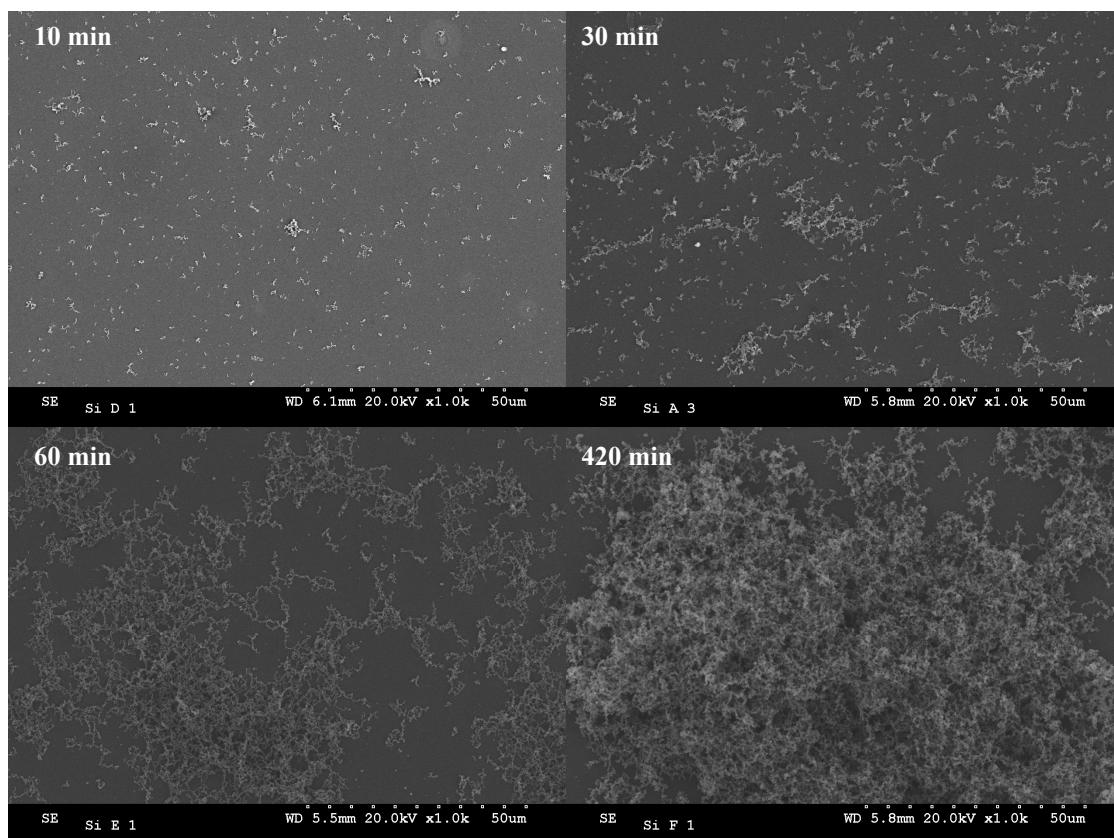


Figura 4.2: Imágenes de SEM en superficie correspondientes a sustratos de silicio monocristalino funcionalizados a temperatura ambiente durante distinto tiempo de inmersión.

Otro de los aspectos característicos de la funcionalización por inmersión en disoluciones de APTS es la falta de reproducibilidad en la distribución de las estructuras coloidales, debido a la gran cantidad de procesos involucrados en la hidrólisis y polimerización del APTS [3, 4]. Mientras que en algunos casos, como los mostrados hasta ahora (figuras 4.1 y 4.2), la distribución de los coloides es bastante aleatoria e

irregular, en otros casos se han obtenido estructuras en las que los aglomerados de coloides se distribuyen uniformemente sobre la superficie como muestra la figura 4.3, correspondiente a un sustrato de silicio monocristalino funcionalizado a temperatura ambiente durante 15 minutos:

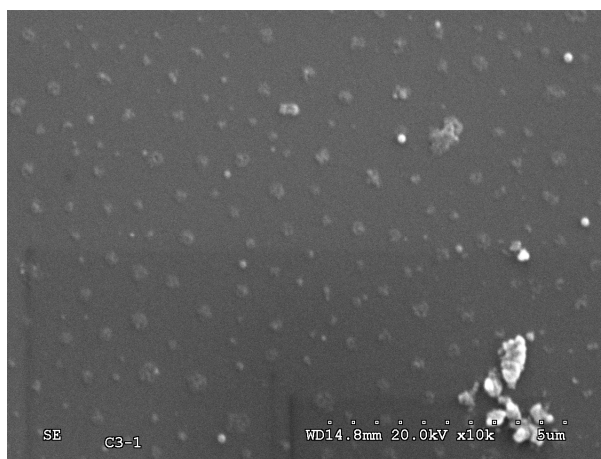


Figura 4.3: Imagen de SEM correspondiente a un sustrato de silicio monocristalino funcionalizado por inmersión a temperatura ambiente durante 15 min.

Otro de los parámetros que influyen en el proceso de funcionalización es la temperatura de la disolución durante el tiempo de inmersión [5]. Para estudiar su influencia en las estructuras obtenidas, la disolución de APTS y tolueno se mantiene durante un tiempo determinado a temperatura ambiente, a continuación se calienta hasta alcanzar la temperatura de estudio y se mantiene durante 5 minutos a dicha temperatura (apartado 2.2.1). La figura 4.4 muestra los depósitos obtenidos en el caso de sustratos funcionalizados en disoluciones que se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos y a continuación se calentaron durante 5 minutos a 60 y 110 °C, respectivamente. Las imágenes muestran que el aumento de la temperatura de la disolución se traduce en la fusión de los coloides entre sí, dando lugar a estructuras con menos volumen y, por tanto, menor espesor. Además, cuanto mayor es la temperatura, mayor es el grado de fusión de los coloides, como se observa al comparar las muestras calentadas hasta 60°C y 110°C, respectivamente. En particular, en algunas zonas de la muestra calentada a 110°C, los coloides llegan a fusionarse completamente y no se distinguen entre sí unos de otros (área limitada por el cuadrado).

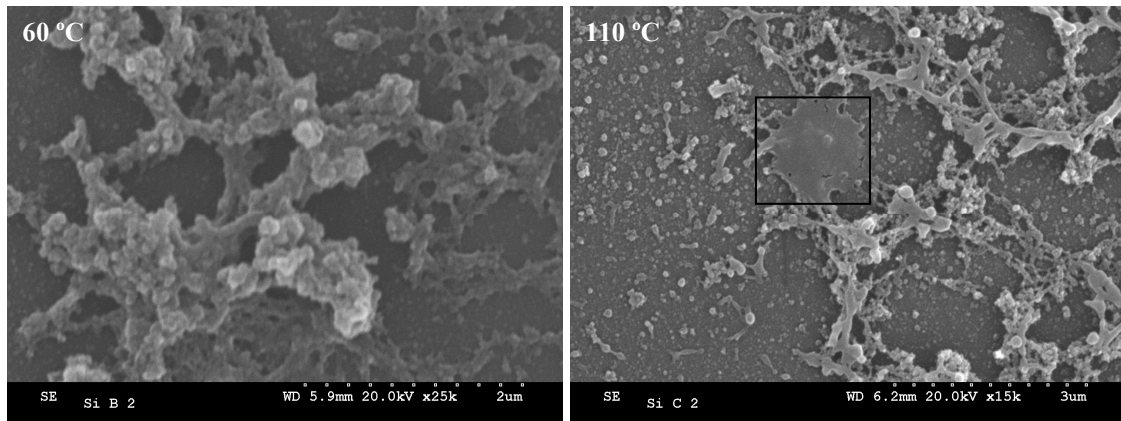


Figura 4.4: Efecto del aumento de temperatura de la disolución sobre la estructura de los coloides obtenidos en sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por inmersión.

A continuación se ha estudiado la estructura que presentan los depósitos obtenidos por inmersión sobre **sustratos de silicio nanoestructurado (SP_n)**. La figura 4.5 muestra las imágenes de SEM en superficie obtenidas para sustratos de SP_n funcionalizados a temperatura ambiente durante 30 minutos y funcionalizados aumentando la temperatura de la disolución hasta 110°C. En los sustratos funcionalizados a temperatura ambiente se observan coloides distribuidos por la superficie, que no forman las estructuras globulares observadas en los sustratos de silicio monocristalino (figura 4.1). Al calentar la disolución, las diferencias observadas en la distribución de los coloides no son tan llamativas como en el caso del silicio monocristalino, obteniéndose estructuras bastante uniformes. Además, el aumento de temperatura se traduce en una menor densidad de coloides sobre la superficie.

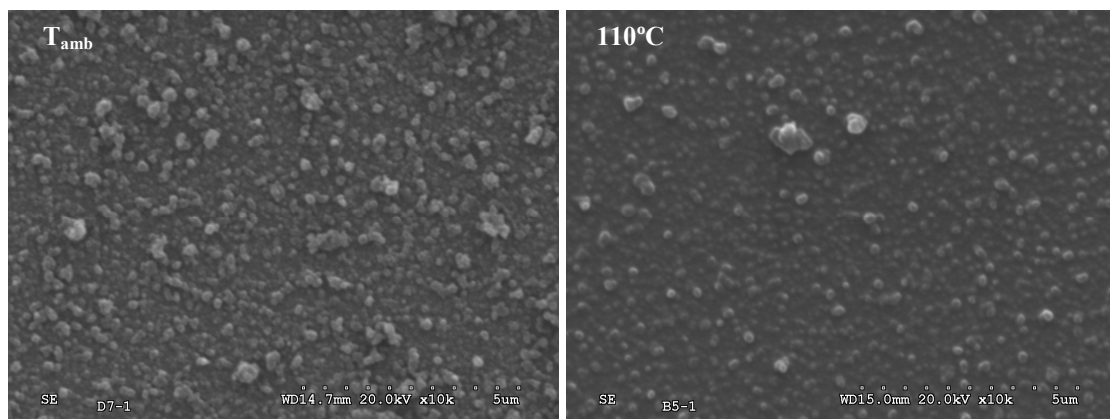


Figura 4.5: Imágenes de SEM correspondientes a muestras de silicio nanoestructurado funcionalizado por inmersión a T_{amb} durante 30 minutos y con aumento de temperatura durante el proceso.

Finalmente, en la figura 4.6 se muestran las estructuras obtenidas tras funcionalizar **sustratos de silicio macroporoso (SP_M)** por inmersión a temperatura ambiente. La imagen A de la figura 4.6 muestra una visión general de la superficie funcionalizada, en la que se observa que la distribución de las estructuras coloidales es escasa y poco uniforme. La imagen B de la figura 4.6 muestra un detalle de una zona en la que se encuentran los depósitos coloidales. En la imagen se observa cómo los coloides se depositan inicialmente sobre las paredes de los poros, reproduciendo la estructura de éstos (zona limitada por el rectángulo, figura 4.6B). Sin embargo, en las zonas en las que el número de coloides es mayor, como en el caso del área encerrada por la elipse, éstos van rellenando y tapando parcialmente la estructura de poros.

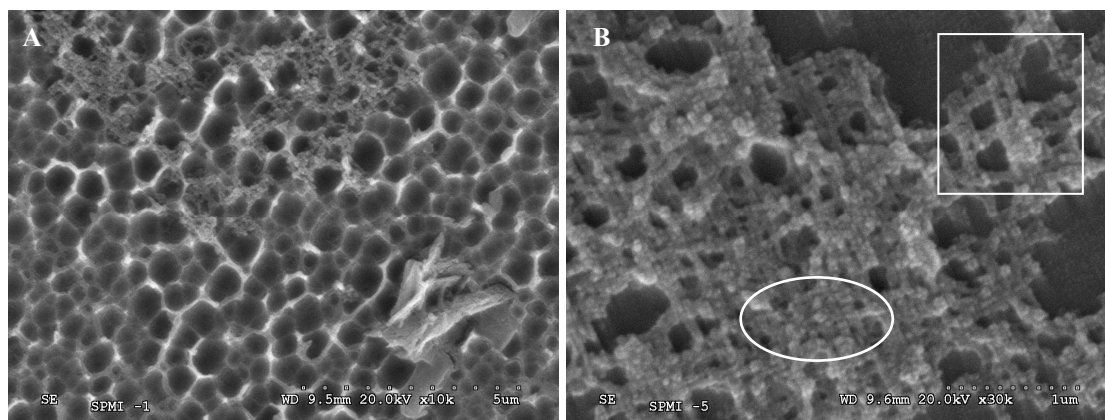


Figura 4.6: Imágenes de SEM correspondientes a sustratos de silicio macroporoso funcionalizados a temperatura ambiente durante 30 minutos, realizadas con 10000 (A) y 30000 (B) aumentos.

Para completar el análisis de la superficie de los sustratos funcionalizados, se ha estudiado la topografía mediante AFM. El estudio se ha realizado para sustratos de silicio monocristalino y de SP_n. No se realizó, sin embargo, en el caso de sustratos de SP_M porque, como se explicó en el capítulo 3, la gran irregularidad y tamaño de las estructuras resultantes dañan las puntas de medida del microscopio de AFM, dando lugar a imágenes distorsionadas.

La figura 4.7 muestra las imágenes correspondientes a **sustratos de silicio monocristalino** funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente durante 10 y 30 minutos, respectivamente. La imagen correspondiente a los sustratos funcionalizados durante 10 minutos presenta un fondo relativamente limpio con coloides dispersos sobre la superficie, mientras que tras 30 minutos, se observa un fondo mucho más rugoso y

con estructuras de coloides de mayor tamaño, de la misma forma que se ha observado por SEM (figura 4.2).

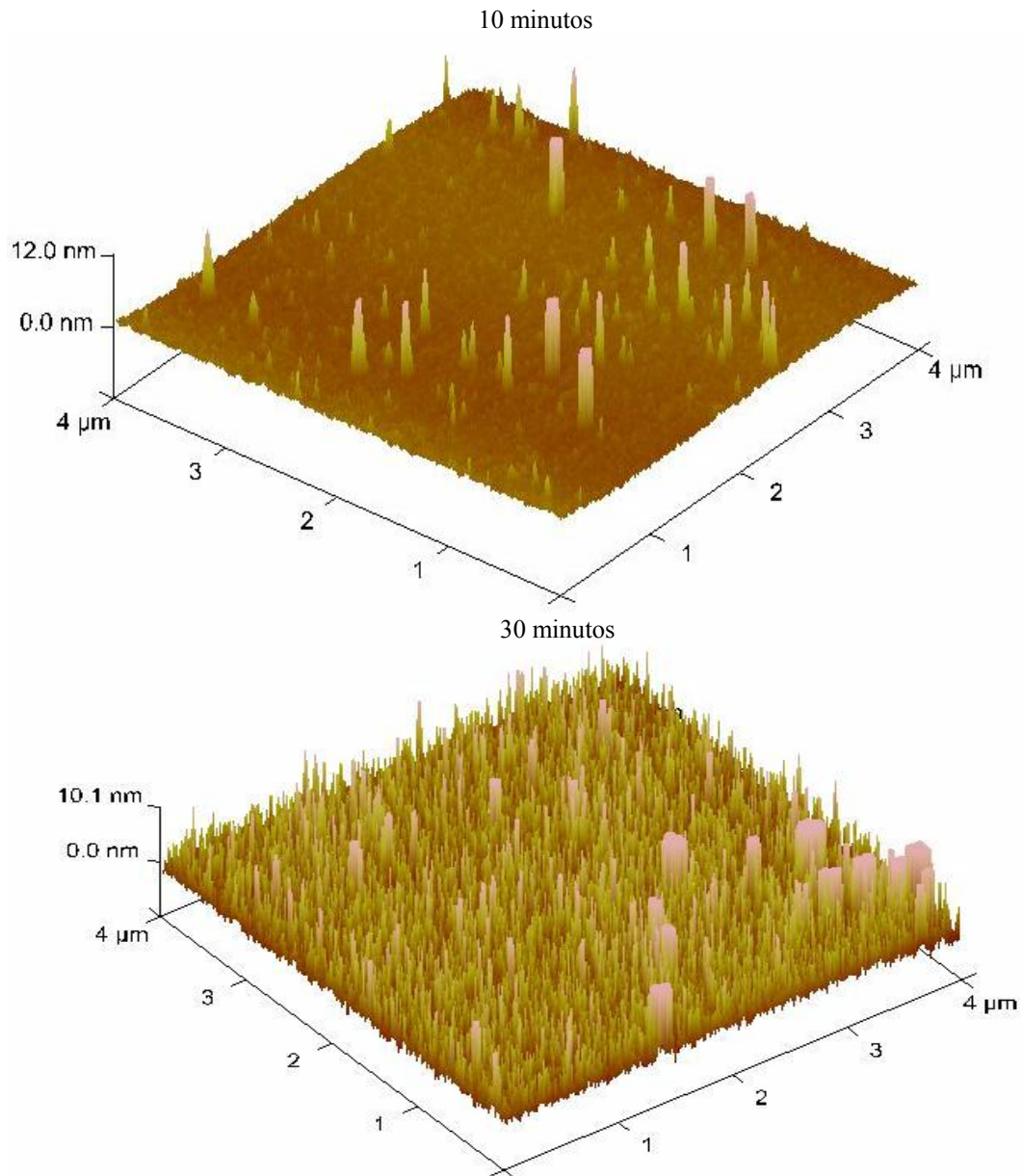


Figura 4.7: Imágenes de AFM correspondientes a sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente durante 10 y 30 minutos.

La rugosidad RMS de las superficies se ha calculado de dos maneras distintas: considerando toda la superficie, incluidas las estructuras coloidales (rugosidad total), y considerando solamente las áreas de la superficie exentas de coloides (rugosidad de fondo). La rugosidad RMS total es (1.0 ± 0.5) nm tras 10 minutos de inmersión y (3.4 ± 0.3) nm tras 30 minutos, lo que se corresponde con un aumento del número y tamaño de los coloides. La rugosidad del fondo es (0.29 ± 0.08) nm en la muestra obtenida tras 10

minutos de inmersión y (1.8 ± 0.1) nm en la de 30 minutos. Estos valores, comparados con la rugosidad del sustrato de silicio original, (0.12 ± 0.02) nm, confirman que el proceso de funcionalización da como resultado la formación de láminas delgadas sobre las que se depositan las estructuras coloidales. Estas láminas delgadas, fijadas a la superficie mediante estructuras siloxano, se definen en la bibliografía como monocapas de oligómeros de APTS, cuyo espesor oscila entre 50 y 100 Å, dependiendo del tiempo de inmersión [6], lo que explica que no se hayan detectado por SEM. Otro dato interesante, es el aumento del tamaño máximo de los coloides al aumentar el tiempo de inmersión, pasando de tamaños comprendidos entre 10 y 35 nm, tras 10 minutos de inmersión, a tamaños entre 20 y 70 nm en el caso de 30 minutos.

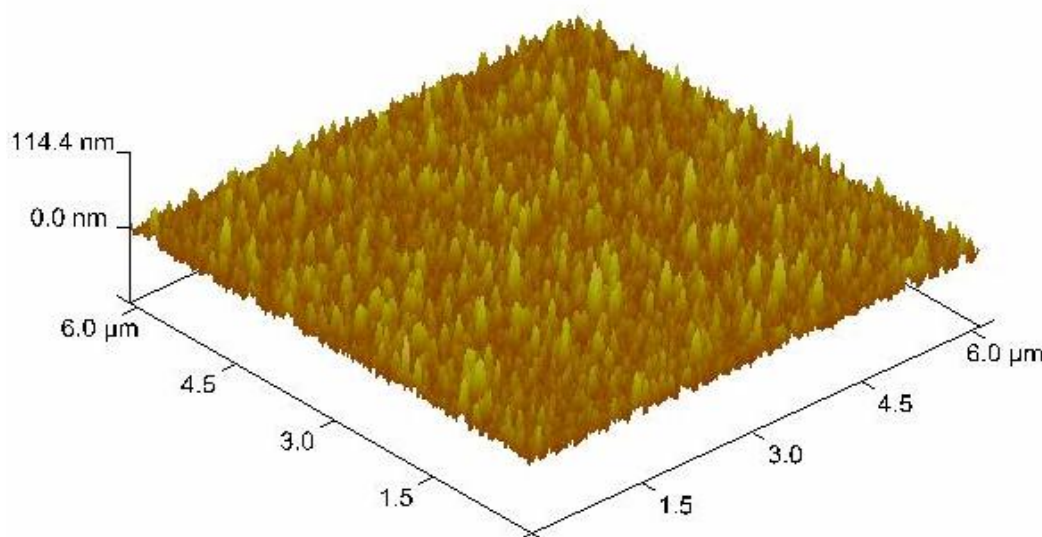


Figura 4.8: Imagen de AFM correspondiente a un sustrato de silicio nanoestructurado funcionalizado a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Las imágenes de AFM obtenidas para **silicio nanoestructurado** funcionalizado por inmersión a temperatura ambiente durante 10 minutos (figura 4.8), muestran una distribución más uniforme de coloides, con tamaños comprendidos entre 25 y 80 nm, tamaños que se corresponden con los encontrados sobre silicio monocristalino tras 30 minutos de inmersión. La rugosidad RMS total es (11 ± 2) nm y la de fondo, es decir, la asociada a las zonas exentas de coloides, es (6 ± 2) nm. Como se vio en el apartado 3.2.1, la rugosidad de los sustratos de SP_n sin funcionalizar es (0.97 ± 0.05) nm, lo que pone de manifiesto la doble modificación superficial, deposición de monocapas de

oligómeros de APTS y formación de estructuras coloidales, producida como consecuencia del proceso de inmersión.

Por último, la influencia del sustrato en las estructuras formadas como consecuencia del proceso de inmersión, se traduce en que los coloides se depositan con una distribución más uniforme y un tamaño mayor para el mismo tiempo de inmersión sobre SP_n que sobre silicio monocristalino y que el aumento de la rugosidad de fondo respecto al correspondiente sustrato sin funcionalizar es del orden de tres veces superior en los sustratos de SP_n que en los de silicio monocristalino.

4.3. Caracterización química.

La caracterización química de los sustratos funcionalizados por la técnica de inmersión se ha realizado por FTIR y XPS. Como en el caso de la morfología, se ha estudiado la influencia de la temperatura de la disolución durante el proceso de funcionalización, comparando los resultados obtenidos sobre sustratos de silicio y SP_n . Los sustratos funcionalizados a temperatura ambiente se denominan de forma abreviada: T_{amb} y los que se calentaron durante 5 minutos a 110°C se denominan: $T_{110^\circ\text{C}}$.

4.3.1. Análisis de FTIR:

Como punto de referencia, se ha medido el espectro del APTS líquido. Para ello, se empleó el dispositivo de medidas de líquidos del espectrómetro de infrarrojos (apartado 2.4.3), consistente en una pastilla de KBr, material transparente al infrarrojo, en la que se deposita un volumen de APTS. De esta forma, las bandas de absorción presentes en el espectro (figura 4.9) son única y exclusivamente las correspondientes al precursor: vibración ν (*stretching*) de aminas primarias (3420 cm^{-1}). Esta banda está compuesta por dos contribuciones correspondientes a las vibraciones simétrica y asimétrica; doblete correspondiente a la vibración ν del enlace CH, del grupo CH_3 (2973 y 2885 cm^{-1}); doblete correspondiente a la vibración ν del enlace CH, del grupo CH_2 (2925 y 2853 cm^{-1}); banda correspondiente a la vibración δ (*wagging*) de aminas primarias (1652 cm^{-1}) y de secundarias/protonadas (1550 cm^{-1}); doblete asociado a la vibración del enlace CH del grupo CH_3 (1450 y 1390 cm^{-1}); vibración δ del grupo CH_2

(1294 cm^{-1}). Vibración Si-O-C del grupo Si-O-CH₂- de las cadenas etoxisilano (1166 cm^{-1}); doblete correspondiente a la vibración asimétrica del Si-O-C (1105 y 1078 cm^{-1}) y a la vibración simétrica (956 cm^{-1}); vibración del enlace Si-C (786 cm^{-1}) y vibración O-Si-O (695 cm^{-1}).

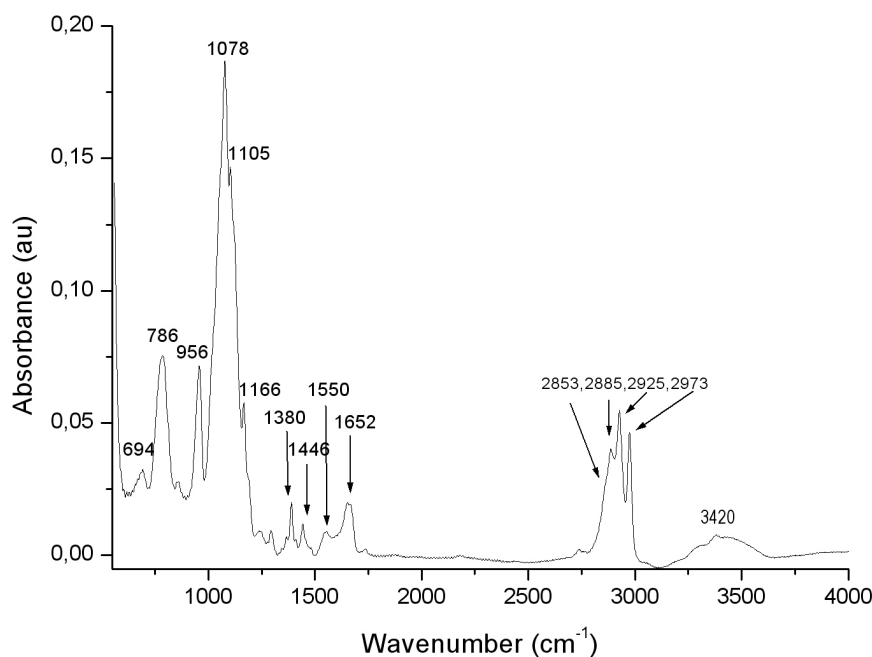


Figura 4.9: Espectro de FTIR del APTS.

El estudio de las bandas de absorción surgidas como consecuencia del proceso de inmersión se ha realizado en primer lugar sobre **sustratos de silicio monocristalino**. La figura 4.10 muestra los espectros en absorbancia correspondientes a muestras T_{amb} y $T_{110^{\circ}\text{C}}$ tras 30 minutos de inmersión a temperatura ambiente.

Los espectros de los sustratos de silicio monocristalino sometidos al proceso de funcionalización muestran la aparición de nuevas bandas de absorción respecto al espectro del APTS, así como variaciones en la posición y en la intensidad de algunos picos comunes. Las nuevas bandas de absorción que aparecen son: 1320 cm^{-1} , (νCH), 2180 cm^{-1} (Si-H) y 2660 cm^{-1} (C-H). Respecto a las bandas comunes con el APTS líquido, las diferencias encontradas como consecuencia del proceso de funcionalización, son las siguientes:

- Se produce un cambio en la relación de intensidades de las bandas asociadas a aminas primarias (1645 cm^{-1}) y secundarias/protonadas (1570 cm^{-1}). De manera que en

el espectro del APTS es mayor la contribución asociada a aminas primarias, mientras que en los espectros correspondientes a las muestras funcionalizadas es mayor la contribución asociada a aminas secundarias/protonadas.

- La banda asociada a la vibración ν de los grupos amino, que en el caso del APTS presentaba un doblete en torno a 3400 cm^{-1} , ahora es un singlete alrededor de 3200 cm^{-1} , correspondiente a grupos amino formando enlaces de gran intensidad mediante puentes de hidrógeno [7]. Los desplazamientos de este pico se relacionan con la intensidad de los enlaces de hidrógeno formados entre grupos amino y silanoles, desplazándose a valores del número de onda menores cuanto mayor es la intensidad del enlace de los puentes de hidrógeno.

- Los dobletes asociados a las vibraciones ν de CH_2 y CH_3 ya no se resuelven en las muestras funcionalizadas, debido al elevado porcentaje de moléculas de APTS que se han hidrolizado perdiendo cadenas etoxi.

- Se produce la sustitución del doblete 1105 y 1078 cm^{-1} , asociado a las vibraciones Si-O-Si y Si-O-C en la molécula de APTS, por el doblete 1035 y 1114 cm^{-1} , asociado a las vibraciones anteriores en oligómeros de APTS [8].

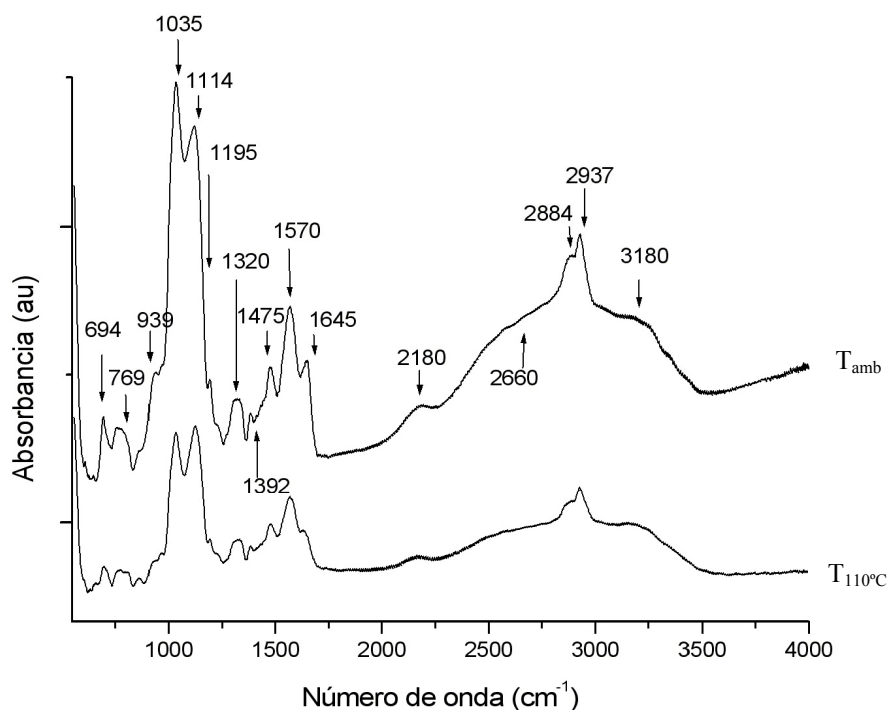
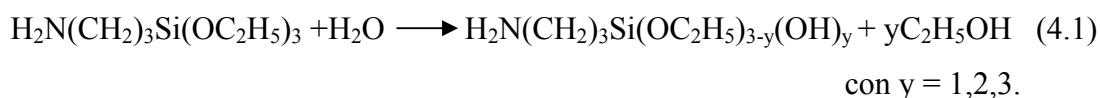
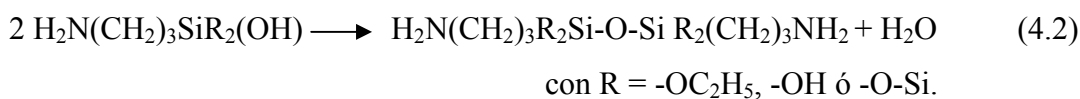


Figura 4.10: Espectros de absorbancia FTIR correspondientes a sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente (T_{amb}) y aumentando la temperatura de la disolución ($T_{110^\circ\text{C}}$).

Todos estos cambios en los espectros se explican por los procesos de hidrólisis y condensación que sufren las moléculas de APTS en disolución. La hidrólisis del APTS dando lugar a la pérdida de las cadenas etoxi (-OEt) está inducida por la presencia de moléculas de agua, que dan lugar a la formación de grupos silanoles (SiOH), reacción 4.1:



Los grupos silanoles resultantes pueden reaccionar formando estructuras siloxano (Si-O-Si). Si los silanos de distintas moléculas de APTS reaccionan entre sí (reacción 4.2) se forman oligómeros de APTS, que son los responsables de la formación de las estructuras coloidales, mientras que si reaccionan con silanos superficiales, se produce la condensación del APTS sobre la superficie, que da lugar a la interacción entre los oligómeros funcionales y los sustratos.



De manera simultánea a los procesos anteriores, los grupos amino pueden formar enlaces por puente de hidrógeno tanto con silanoles de la superficie como con silanoles de moléculas de APTS hidrolizadas.

En general, se produce una combinación de todos estos procesos, lo que implica pérdida de cadenas etoxi (que se traduce en la desaparición de los dobletes ν_{CH} en los espectros de FTIR), formación de estructuras siloxano (doblete 1035 y 1114 cm^{-1}) e interacción de grupos amino entre sí y con silanoles, tanto de otras moléculas de APTS hidrolizadas como de la superficie mediante la formación de enlaces por puente de hidrógeno (3200 cm^{-1}).

Al aumentar la temperatura de la disolución, la diferencia fundamental observada en los espectros viene dada por la disminución de la anchura de la banda comprendida entre 1000 y 1200 cm^{-1} , que está constituida por la superposición de las vibraciones Si-O-C y Si-O-Si. Esta disminución de anchura implica un mayor grado de

polimerización del APTS en las muestras funcionalizadas a temperatura ambiente, lo que se corresponde a su vez con las observaciones realizadas por SEM.

El área bajo la curva correspondiente a las bandas de absorción más intensas de los espectros de la figura 4.10, así como la relación entre los dos tipos de muestra, se recogen en la tabla 4.1. Es interesante observar que el área bajo la curva es mayor en la muestra funcionalizada a temperatura ambiente, en un factor prácticamente constante en todas las bandas de absorción, por lo que de acuerdo con la ley de Lambert-Beer (apartado 2.4.3), se puede suponer que las estructuras obtenidas en dichas condiciones son del orden de 1.4 veces más gruesas que las obtenidas tras calentar. Sin embargo, al comparar la relación obtenida para las aminas primarias (1640 cm^{-1}) y las secundarias (1570 cm^{-1}) en función de la temperatura, se observa que el valor correspondiente a aminas primarias es bastante superior, 2.5, lo que significa que el aumento de la temperatura de la disolución no sólo produce una diferencia en el espesor asociado a las estructuras coloidales sino también en la eficiencia de la funcionalización, al obtenerse una menor cantidad de aminas primarias al funcionalizar con aumento de temperatura de la disolución.

Intervalo (cm^{-1})	SiT _{amb}	SiT _{110°C}	Relación
1030-1160	4,30	3,02	1,4
1570-1640	0,71	0,46	1,5
2880-2940	0,54	0,42	1,3
1570	0,56	0,40	1,4
1645	0,15	0,06	2,5

Tabla 4.1: Área bajo la curva asociada a las bandas de absorción de FTIR de los sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por inmersión.

Los espectros de absorbancia correspondientes a los sustratos de **silicio nanoestructurado**, funcionalizados en idénticas condiciones a los anteriores se muestran en la figura 4.11. En este caso, las contribuciones más importantes son las asociadas a enlaces SiH_x y Si-Si procedentes del propio sustrato de SP_n (apartado 3.2.2), así como las presentes en el rango $1060\text{-}1180\text{ cm}^{-1}$, en el que se superponen las bandas asociadas a estructuras Si-O-Si y Si-O-C, características de la formación de oligómeros, y las asociadas a la oxidación del SP_n . La posición y el nivel de desdoblamiento de los máximos en este rango son más parecidos a los observados en el espectro de APTS (figura 4.9) que a los observados en los sustratos de silicio funcionalizados (figura

4.10), lo que implica un menor grado de polimerización del APTS. Las bandas de absorción características del proceso de funcionalización y las correspondientes a grupos amino y enlaces CH_x , son apenas detectables entre las interferencias producidas por las películas de silicio poroso y se aprecian más en términos de cambios en el patrón de interferencias que como auténticas bandas de absorción. Este hecho ha motivado que el estudio detallado de la composición de las estructuras resultantes sobre SP_n se haya completado con los espectros de XPS.

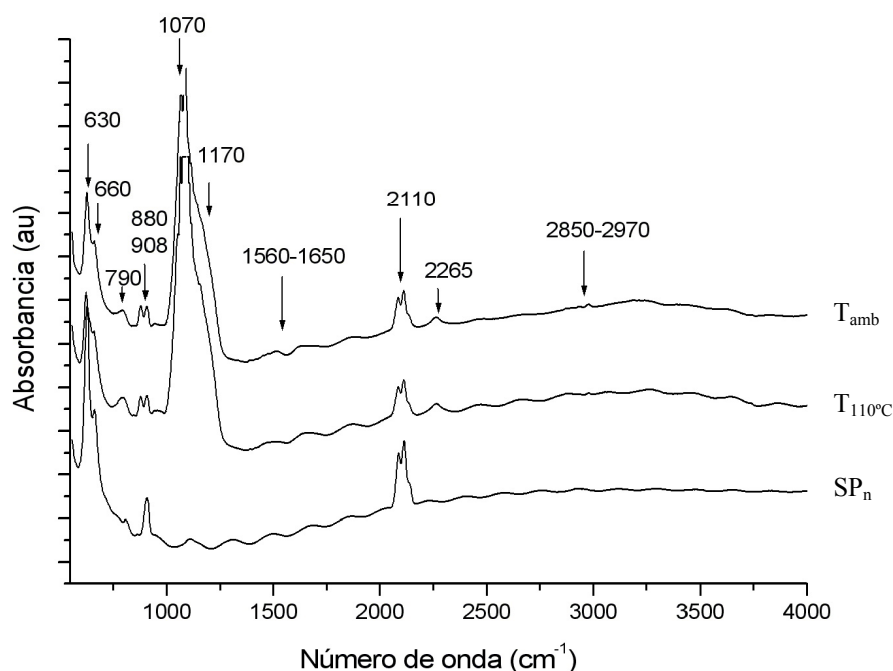


Figura 4.11: Espectros de absorbancia FTIR correspondientes a sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente (T_{amb}) y aumentando la temperatura de la disolución ($T_{110^\circ\text{C}}$).

Finalmente, en la caracterización por FTIR de los sustratos de **silicio macroporoso** funcionalizado, se encontró el mismo problema que en los sustratos sin funcionalizar, esto es, que debido al elevado tamaño de poro, el espectro obtenido es básicamente el de la oblea de silicio monocristalino, como se explicó en el apartado 3.1. Además, la presencia de coloides tras la funcionalización es bastante baja (figura 4.6) lo que explica que tras la inmersión se siga obteniendo el espectro correspondiente a la oblea de silicio.

4.3.2. Análisis de XPS:

A continuación se ha realizado el análisis de la composición química superficial mediante XPS (apartado 2.4.5), técnica que permite identificar y cuantificar los elementos presentes en las muestras y hallar de forma precisa su estado químico. El análisis se realizó en primer lugar sobre **sustratos de silicio monocristalino**. La figura 4.12 muestra los espectros correspondientes a sustratos de silicio funcionalizados a temperatura ambiente durante todo el proceso (T_{amb}) y calentando la disolución ($T_{110^{\circ}C}$), tras 30 minutos de inmersión a temperatura ambiente. Los elementos presentes en ambos casos son Si, C, O y N, que son los elementos que componen la molécula de APTS, además de F. Este F proviene de la contaminación producida al guardar las muestras de silicio monocristalino y silicio poroso en un recipiente común durante el transporte hasta el laboratorio de medida. No obstante, su cantidad es menor al 2 % en porcentaje atómico. El porcentaje en que se encuentran el resto de elementos se muestra en la tabla 4.2.

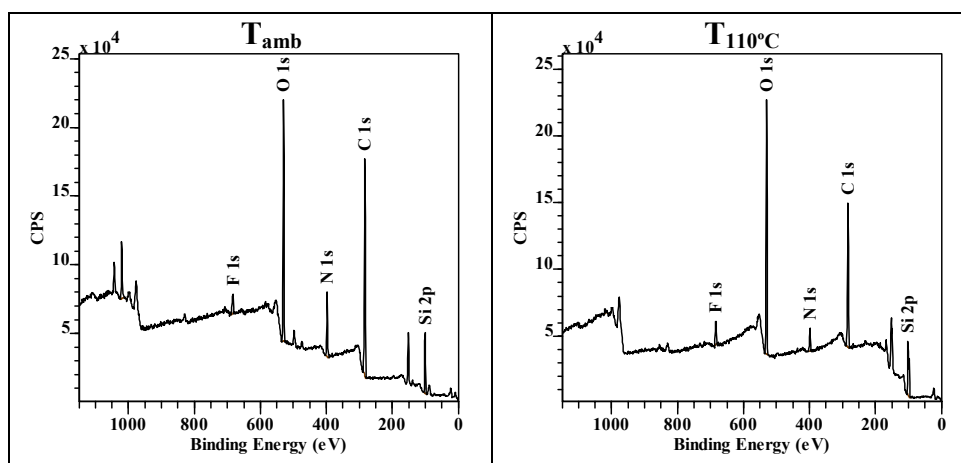


Figura 4.12: Espectros de XPS correspondientes a sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente (T_{amb}) y aumentando la temperatura de la disolución ($T_{110^{\circ}C}$).

	Si %	O %	C %	N %
Si T_{amb}	11	23	53	11
Si $T_{110^{\circ}C}$	20	23	43	5

Tabla 4.2: Porcentajes atómicos de los elementos presentes en los sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente (T_{amb}) y calentando la disolución ($T_{110^{\circ}C}$).

Los sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente presentan una relación Si/O igual a 0.47, prácticamente la

correspondiente al óxido estequiométrico, y una relación Si/N igual a 1, el mismo valor que tiene la relación Si/N en la molécula de APTS. Sin embargo, los sustratos funcionalizados con aumento de temperatura de la disolución presentan un valor superior como consecuencia de una mayor cantidad de Si.

El estudio de la relación C/N permite realizar una estimación promedio sobre el número de grupos silanoles (Si-OH) mediante los que las moléculas de APTS hidrolizadas condensan sobre la superficie formando estructuras siloxano (Si-O-Si) [9]. De este modo, un valor C/N igual a 7 corresponde con la condensación a través de un grupo silanol, un valor C/N igual a 5 corresponde con moléculas de APTS que condensan mediante la formación de dos estructuras siloxano y uno de C/N igual a 3, con moléculas de APTS que condensan a través de 3 grupos silanoles. Los valores de la relación C/N obtenidos a partir de la tabla 4.2 permiten proponer que la condensación se produce en promedio a través de dos grupos silanoles para los sustratos de silicio monocristalino funcionalizados a temperatura ambiente, y a través de uno o menos en el caso de los sustratos funcionalizados con aumento de temperatura.

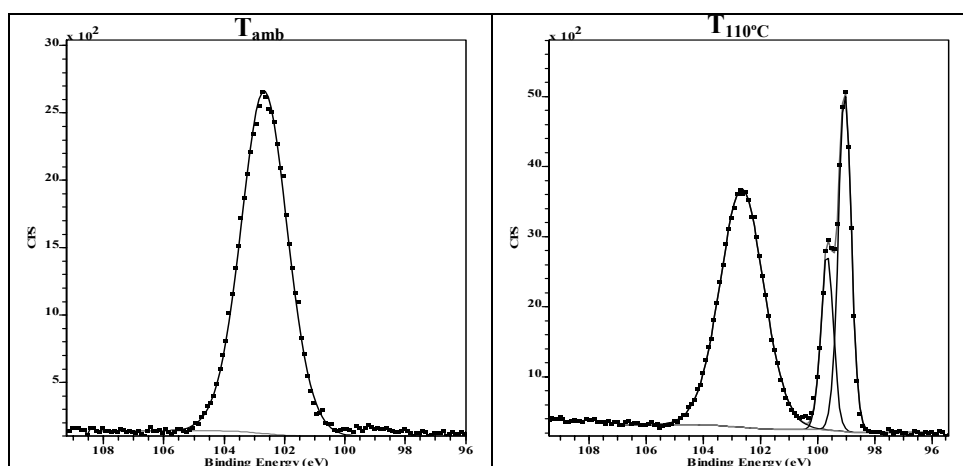


Figura 4.13: Espectro de alta resolución del Si 2p correspondiente a sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente (T_{amb}) y aumentando la temperatura de la disolución ($T_{110^{\circ}C}$).

Por último, el porcentaje de N obtenido al llevar a cabo el proceso de funcionalización a temperatura ambiente es aproximadamente el doble que en el proceso realizado con aumento de temperatura.

A continuación se han analizado los espectros de alta resolución de cada uno de los elementos, para estudiar el estado químico en que se encuentran. El espectro de alta resolución del pico Si2p (figura 4.13) muestra diferencias significativas en función de la

temperatura de la disolución durante el proceso de funcionalización. La muestra T_{amb} presenta una componente centrada en 102.7 eV, correspondiente a subóxidos de Si (SiO_x), mientras que la muestra $T_{110^\circ C}$ presenta, además de la componente anterior, otra asociada al doblete Si $2p_{3/2}$ (99.1 eV) y Si $2p_{1/2}$ (99.7 eV), que supone el 38% del total de Si y que proviene del sustrato de silicio monocristalino. Esta diferencia puede explicarse en términos de la diferente estructura de coloides observada en las imágenes de SEM (figura 4.4), en las que se observa que el aumento de temperatura produce una disminución en el volumen asociado a las estructuras coloidales. También la relación de áreas bajo la curva obtenida a partir de los espectros de FTIR (tabla 4.1), indica que el aumento de temperatura de la disolución produce una diferencia de grosor de las estructuras resultantes. Todo esto explica a su vez las diferencias encontradas en los valores de Si/O y Si/N.

El espectro de alta resolución del C1s (figura 4.14) muestra las mismas componentes con independencia de la temperatura de la disolución: una componente centrada en 284.6 eV correspondiente a C en hidrocarburos, una segunda componente centrada en 285.6 eV, asociada a enlaces C-N y una última componente, centrada en 287.9 eV, asociada a enlaces CO.

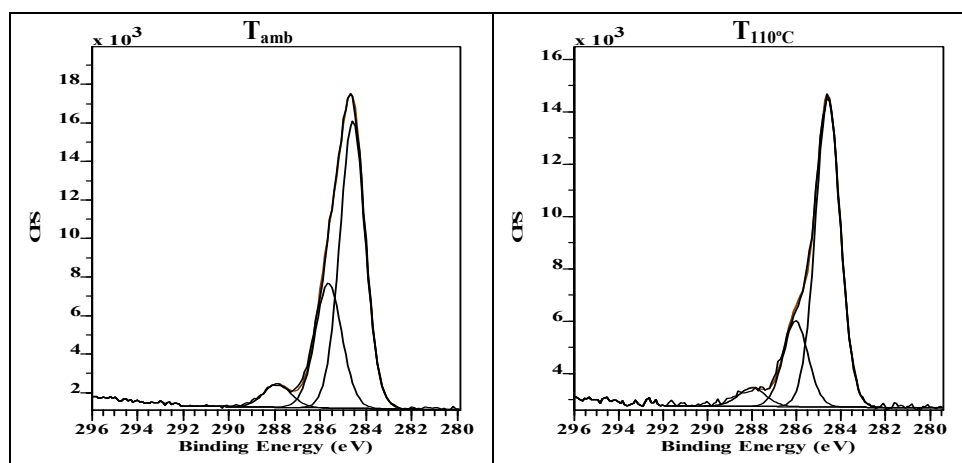


Figura 4.14: Espectro de alta resolución del C 1s correspondiente a sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente (T_{amb}) y aumentando la temperatura de la disolución ($T_{110^\circ C}$).

Las diferencias observadas en función de la temperatura se relacionan con el porcentaje asociado a cada una de las componentes en que puede descomponerse el pico C1s (tabla 4.3). Así, los sustratos funcionalizados con aumento de temperatura de la

disolución tienen un mayor porcentaje de C en forma de hidrocarbono, mientras que la componente asociada a enlaces CN es menor, lo que está en concordancia con el hecho de haber obtenido un porcentaje menor de N (tabla 4.2).

%	C hidroc.	CN	CO
Si T _{amb}	65	29	6
Si T _{110°C}	74	21	5

Tabla 4.3: Contribución de los distintos estados químicos al pico C 1s de los sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente (T_{amb}) y aumentando la temperatura de la disolución (T_{110°C}).

Por último, el pico de alta resolución del N 1s (figura 4.15) muestra dos componentes, tanto en los sustratos funcionalizados a temperatura ambiente como en los funcionalizados con aumento de temperatura de la disolución. La componente de menor energía, centrada en 399.4 eV, se asocia a grupos amino, y la de mayor energía, centrada en 401.1 eV asociada a NH₃⁺, que aparece como consecuencia de la interacción de los grupos amino con silanoles de la superficie o de otras moléculas de APTS [10, 11]. La diferencia encontrada en función de la temperatura es que el porcentaje N en forma de grupos amino en la muestra T_{amb} es del 86 % frente a 51 % en la muestra T_{110°C}.

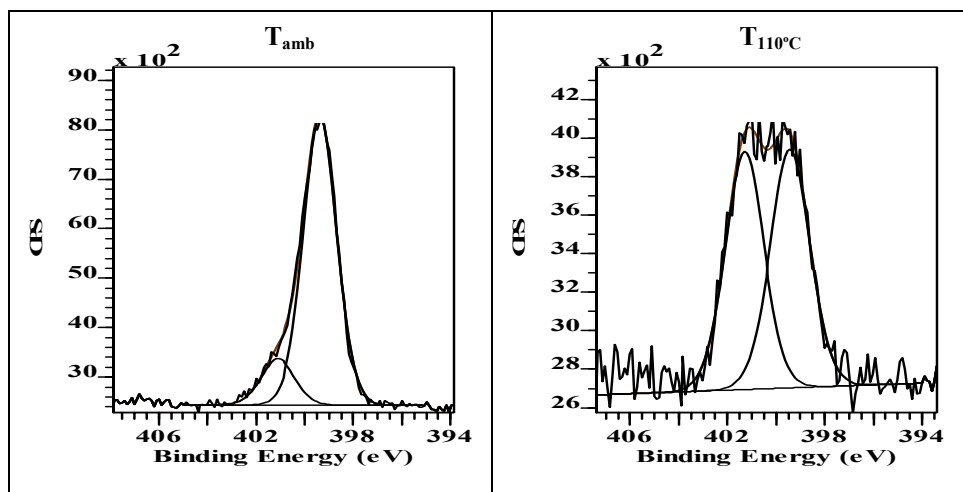


Figura 4.15: Espectro de alta resolución del N 1s correspondiente a sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente (T_{amb}) y aumentando la temperatura de la disolución (T_{110°C}).

De los resultados anteriores se deduce que el proceso de funcionalización por inmersión de sustratos de silicio monocristalino da como resultado la formación de estructuras con un mayor espesor asociado y que presentan un mayor grado de polimerización al funcionalizar los sustratos manteniendo la disolución a temperatura

ambiente durante todo el proceso. La eficiencia del proceso realizado íntegramente a temperatura ambiente es mayor al dar como resultado una mayor concentración de nitrógeno sobre la superficie, con un porcentaje del mismo en forma de grupos amino superior. Además, se espera que la interacción de los depósitos funcionales y el sustrato sea más estable que en el caso de $T_{110^{\circ}\text{C}}$ ya que la condensación de las moléculas de APTS sobre la superficie se realiza a través de dos grupos silanoles en promedio en lugar de uno o menos como consecuencia del proceso a temperatura ambiente.

A continuación se ha repetido el mismo estudio sobre **sustratos de silicio nanoestructurado**. Los espectros correspondientes a muestras funcionalizadas a temperatura ambiente y calentando la disolución (figura 4.16) muestran la presencia de Si, O, C, y N, así como de F, éste último en concentraciones inferiores al 2%. El porcentaje atómico en que se encuentran los elementos restantes se recoge en la tabla 4.4.

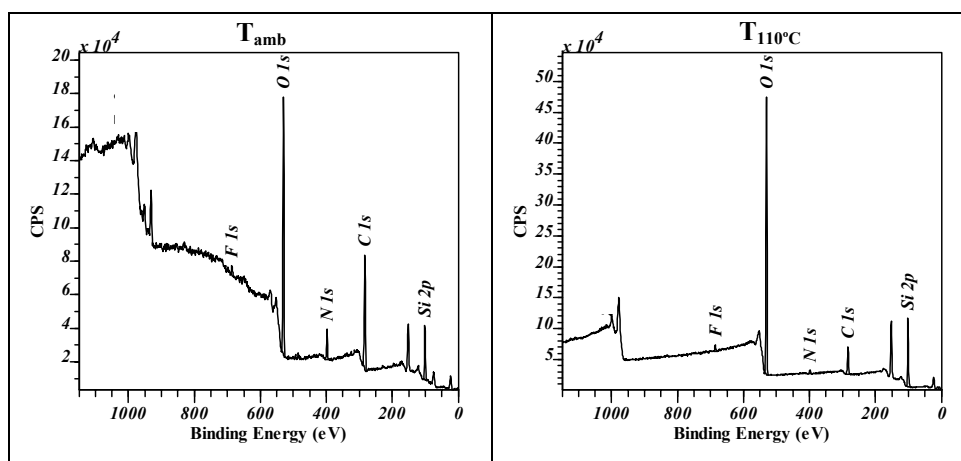


Figura 4.16: Espectros de XPS correspondientes a sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente (T_{amb}) y aumentando la temperatura de la disolución ($T_{110^{\circ}\text{C}}$).

La relación Si/O es 0.42 y 0.49 para las muestras funcionalizadas a temperatura ambiente (T_{amb}) y con aumento de temperatura de la disolución ($T_{110^{\circ}\text{C}}$), respectivamente, es decir, muy próxima a la correspondiente al óxido estequiométrico en ambos casos. La relación Si/N es 2.1 en el caso de T_{amb} y 13.5 en el caso de $T_{110^{\circ}\text{C}}$, es decir, la cantidad de N detectada es menor a la correspondiente en una molécula de APTS. Como en los sustratos de silicio monocristalino, la eficiencia del proceso de funcionalización es mayor en las muestras funcionalizadas a temperatura ambiente, al presentar una concentración de N que es 3.5 veces superior a la que presentan las

muestras funcionalizadas con aumento de temperatura. Los valores de C/N muestran que las moléculas de APTS condensan sobre la superficie mediante 1.5 grupos silano y mediante 1 por molécula de APTS para T_{amb} y $T_{110^{\circ}C}$, respectivamente.

	Si %	O %	C %	N %
SP T_{amb}	15	36	41	7
SP $T_{110^{\circ}C}$	27	55	14	2

Tabla 4.4: Porcentajes atómicos de los elementos presentes en los sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente (T_{amb}) y aumentando la temperatura de la disolución ($T_{110^{\circ}C}$).

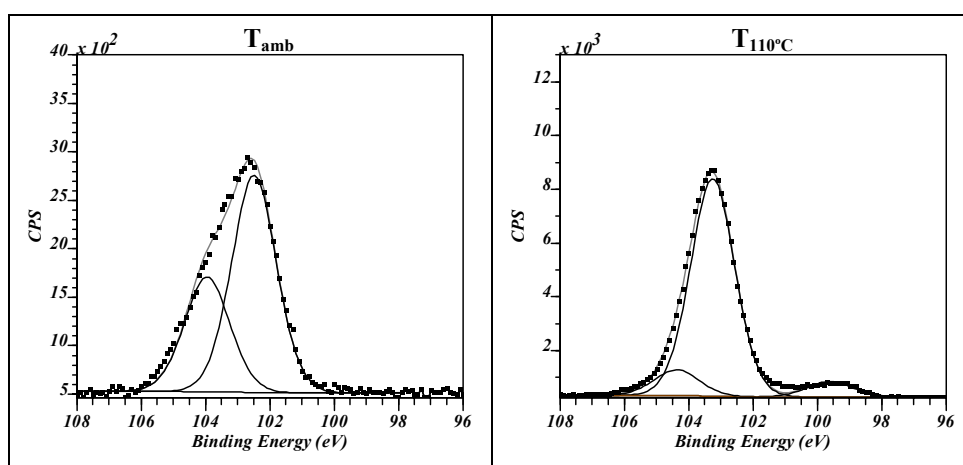


Figura 4.17: Espectro de alta resolución del Si 2p correspondiente a sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente (T_{amb}) y aumentando la temperatura de la disolución ($T_{110^{\circ}C}$).

El análisis de los espectros de alta resolución de los elementos presentes en las muestras permite determinar las distintas contribuciones asociadas a cada uno de ellos. El espectro de alta resolución del Si 2p (figura 4.17), presenta diferencias en función de la temperatura. Las muestras funcionalizadas a temperatura ambiente presentan un pico principal que se descompone a su vez en dos contribuciones correspondientes a estructuras Si-O-C (105.2 eV) y subóxidos (102.5 eV). El pico correspondiente a Si-O-C, que son los enlaces que forman la unión entre el Si central y las cadenas etoxi en la molécula de APTS, no aparecía en los sustratos de silicio monocristalino, lo que indica que se ha producido un menor grado de hidrólisis del APTS sobre silicio nanoestructurado. Las muestras funcionalizadas con aumento de temperatura presentan las dos contribuciones anteriores y además una tercera asociada a estados no oxidados del Si, del mismo modo que ocurría en el caso de los sustratos de silicio monocristalino. Esta componente asociada a estados no oxidados se puede atribuir al sustrato de SP_n ,

como consecuencia del menor volumen que presentan las estructuras obtenidas al calentar. La contribución de cada una de las componentes anteriores al pico del Si 2p se muestra en la tabla 4.5. El porcentaje asociado a Si-O-C es mayor en las muestras funcionalizadas con aumento de temperatura de la disolución, lo que pone de manifiesto que en estas condiciones el APTS se hidroliza en menor proporción.

%	Si 2p	Si-O-C	SiO _x
SP T_{amb}	-	65	34
SP T_{110°C}	6	84	10

Tabla 4.5: Contribución de cada una de las componentes del Si 2p de los sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente (T_{amb}) y aumentando la temperatura de la disolución (T_{110°C}).

El pico de alta resolución del C 1s (figura 4.18) muestra, además de las componentes que se encontraron sobre los sustratos de silicio monocristalino, esto es, C en forma de hidrocarburos, enlaces C-N y enlaces CO, la aparición de una nueva componente, centrada en 288.6 eV, correspondiente a estructuras COOR.

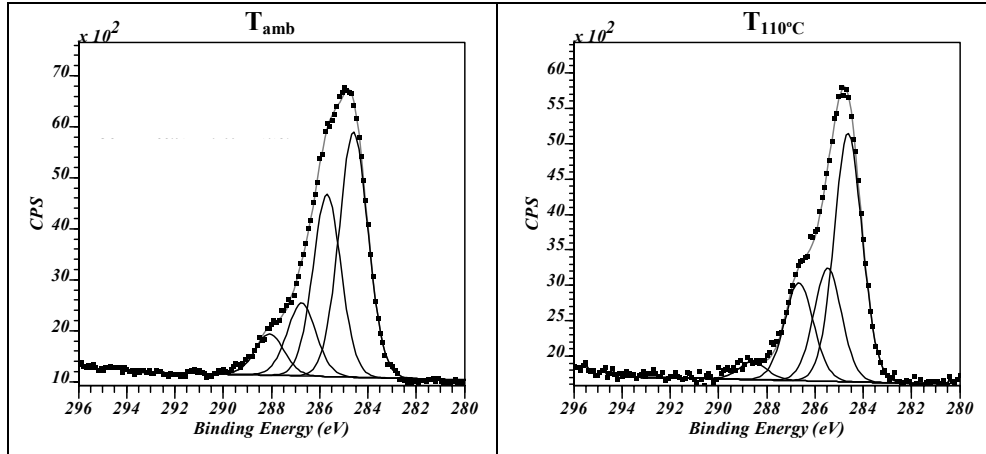


Figura 4.18: Espectro de alta resolución del C 1s correspondiente a sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente (T_{amb}) y aumentando la temperatura de la disolución (T_{110°C}).

La tabla 4.6 recoge la contribución de cada una de las componentes al pico total del C1s. Al igual que en los sustratos de silicio monocristalino, en el caso del silicio nanoestructurado, los sustratos funcionalizados con aumento de temperatura presentan un mayor porcentaje de C en forma de hidrocarburo y un menor porcentaje en forma de enlaces CN. Además, la mayor proporción de C en forma CO, demuestra que la

polimerización es menor, al haber menos cantidad de grupos etoxi hidrolizados que en el caso del silicio monocristalino, y menos en las muestras funcionalizadas a temperatura ambiente que en las que se aumentó la temperatura de la disolución durante el proceso.

%	C hidroc.	CN	CO	COOR
SP T _{amb}	46	38	13	7
SP T _{110°C}	52	24	21	4

Tabla 4.6: Contribución de cada una de las componentes del C 1s correspondiente a sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente (T_{amb}) y aumentando la temperatura de la disolución (T_{110°C}).

Para finalizar, se ha analizado el espectro de alta resolución asociado al nitrógeno, que presenta dos componentes asociadas a grupos amino y aminas protonadas, respectivamente (figura 4.19).

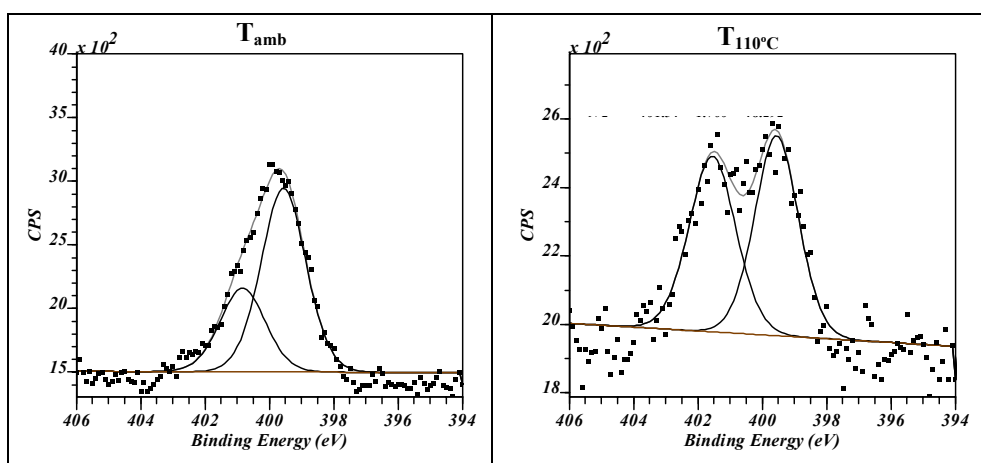


Figura 4.19: Espectro de alta resolución del N 1s correspondiente a sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente (T_{amb}) y aumentando la temperatura de la disolución (T_{110°C}).

El porcentaje de N en forma de grupos amino es 69 % en el caso de las muestras funcionalizadas a temperatura ambiente frente al 52 % en las muestras funcionalizadas con aumento de temperatura de la disolución. De esta manera, si se comparan los resultados obtenidos al aumentar la temperatura de la disolución en el proceso de inmersión sobre sustratos de silicio nanoestructurado, se obtienen las mismas conclusiones que sobre silicio monocristalino, esto es, las estructuras resultantes presentan un mayor volumen asociado y un mayor porcentaje de N, con una componente asociada a grupos amino mayor en el caso de las funcionalización a temperatura ambiente.

Muestra	NH ₂ (%)	Muestra	NH ₂ (%)
Si T _{amb}	10	SP T _{amb}	5
Si T _{110°C}	3	SP T _{110°C}	1

Tabla 4.7: Porcentajes de N en forma de grupos amino obtenidos para los sustratos de silicio monocristalino y silicio nanoestructurado funcionalizados por inmersión en función de la temperatura de la disolución.

Al comparar los resultados obtenidos sobre los sustratos de silicio monocristalino y silicio nanoestructurado, se observa que la hidrólisis que sufren las moléculas de APTS es menor sobre SP_n que sobre silicio monocristalino, y por tanto, éstas se unen a la superficie mediante la formación de un número promedio menor de estructuras siloxano por molécula (Si-O-Si). Para finalizar, se ha estudiado el porcentaje de N en forma de grupos amino lo que permite evaluar la eficiencia de funcionalización en función de la temperatura y del sustrato empleado. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 4.7. Estos valores muestran que el proceso realizado íntegramente a temperatura ambiente da como resultado el triple de grupos amino, en el caso de los sustratos de silicio monocristalino, y cinco veces más, en el caso del SP_n, que el proceso realizado con aumento de temperatura de la disolución. Si se comparan los valores obtenidos para cada uno de los sustratos funcionalizados en las mismas condiciones de inmersión, la eficiencia del proceso de funcionalización es mayor para los sustratos de silicio monocristalino que para los de SP_n, en concreto dos veces superior para el proceso realizado a temperatura ambiente y tres veces para el proceso realizado con aumento de temperatura de la disolución.

4.4. Interacción sustrato/estructura biofuncional.

Como se ha visto a través de los valores de la relación C/N obtenidos por XPS, la interacción de las moléculas de APTS con los sustratos tiene lugar mediante la formación de estructuras siloxano (Si-O-Si) a través de 1, 2 o 3 grupos silanoles formados tras la hidrólisis por cada molécula de APTS en promedio, de manera que cuanto mayor sea este número, la interacción entre el sustrato y los depósitos funcionales será de mayor intensidad. Para verificar el supuesto anterior, las muestras funcionalizadas se han sumergido en disoluciones que contienen distintas

concentraciones salinas (apartado 2.4.8). La concentración salina de una disolución se relaciona con la fuerza iónica, que es una medida de la reactividad de los iones presentes en la disolución. Dicha reactividad es competitiva con la interacción sustrato/depósito funcional. De esta manera, para evaluar la intensidad de dicha interacción, las muestras funcionalizadas e incubadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se sumergieron en disoluciones con fuerza iónica creciente (apartado 2.4.8) y se midió la concentración de FITC que queda en disolución tras un cierto tiempo. Puesto que los grupos amino de la superficie funcionalizada y la FITC reaccionan formando enlaces covalentes, los valores de concentración de FITC encontrados en la disolución provienen de los depósitos funcionales que se han desprendido del sustrato, de forma que, cuanto mayor sea el valor de la concentración, menor es la intensidad de la interacción frente a la fuerza iónica.

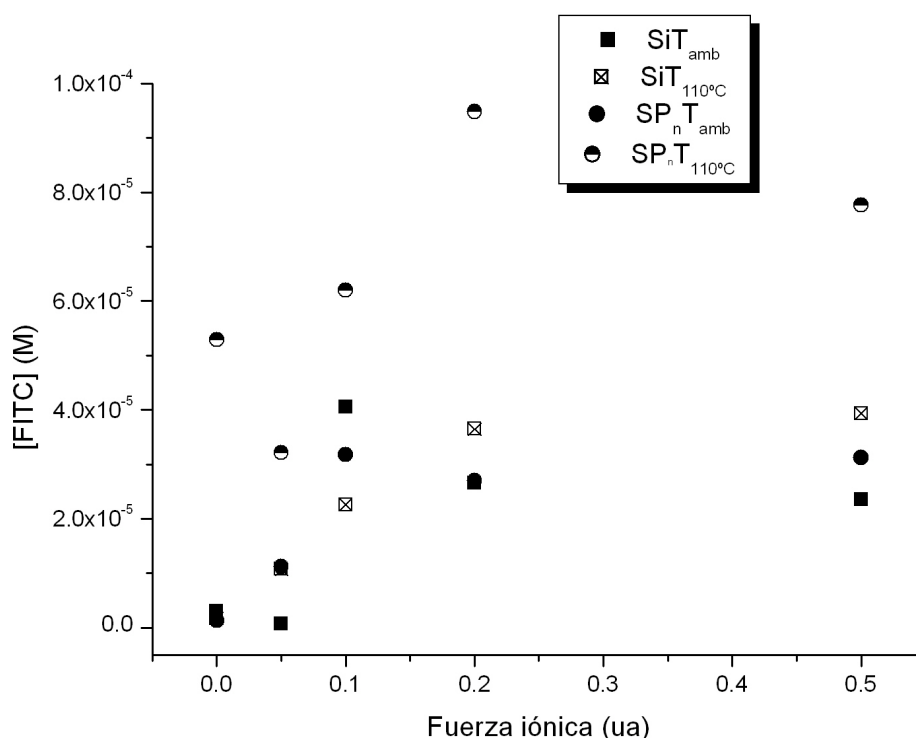


Figura 4.20: Concentración de FITC presente en disoluciones con diferente fuerza iónica, para sustratos de silicio monocristalino y silicio nanoestructurado funcionalizados por inmersión en función de la temperatura de la disolución.

Los valores de concentración de FITC obtenidos en las disoluciones con fuerza iónica creciente tras 20 días, se muestran en la figura 4.20. Tanto en los sustratos de silicio monocristalino como en los de silicio nanoestructurado funcionalizados con

independencia de la temperatura de la disolución durante el proceso, la concentración de fluoresceína medida en las disoluciones aumenta con la fuerza iónica hasta 0.1 ua. A partir de ese valor, la concentración de FITC tiende a estabilizarse. En ambos sustratos, la concentración de FITC medida en disolución es mayor en las muestras funcionalizadas con aumento de temperatura de la disolución durante el proceso de inmersión. Este comportamiento se explica a partir de los valores de la relación C/N encontradas por XPS (apartado 4.3.2), que indicaban que la interacción de las moléculas de APTS con el sustrato se producía mediante dos grupos etoxi en las muestras funcionalizadas a temperatura ambiente, mientras que la interacción era mediante un solo grupo y, por tanto, más débil en las que se sometieron a aumento de temperatura durante el proceso. Al comparar los resultados obtenidos en silicio monocristalino y SP_n, la concentración en disolución es ligeramente mayor en el caso del SP_n. Esto se explica de nuevo a partir de la relación C/N, que presentaba valores mayores para el silicio monocristalino, lo que significa la interacción mediante un número de grupos etoxi mayor y, por tanto, más intensa.

En cualquier caso, es interesante destacar que la concentración de FITC en disolución obtenida en el caso más desfavorable (sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados con aumento de temperatura) es tan sólo un orden de magnitud mayor que la correspondiente a la disolución con fuerza iónica cero y prácticamente despreciable. Se puede por lo tanto concluir que el enlace de los grupos amino a la superficie de las muestras es estable respecto a la fuerza iónica, con la salvedad de las diferencias antes mencionadas.

4.5. Reactividad superficial.

Después de la caracterización de las muestras obtenidas tras el proceso de funcionalización por inmersión realizada en los apartados anteriores, se ha estudiado la funcionalidad de las mismas, esto es, la reactividad superficial de los depósitos obtenidos. Aunque la reactividad está determinada parcialmente por la concentración de grupos amino en superficie, cuantificada por XPS, también es dependiente de la accesibilidad que los grupos amino presentan para reaccionar con diversas moléculas y

que depende, entre otros factores, de su orientación sobre la superficie. Para evaluar la influencia de estos factores, se han empleado dos moléculas de distinto tamaño que reaccionan selectivamente con grupos amino, isotiocianato de fluoresceína (10 Å) y nitrobenzaldehído (5 Å), cuya presencia se ha detectado mediante microscopía de fluorescencia y absorbancia en el ultravioleta, respectivamente.

4.5.1. Análisis de fluorescencia.

El primero de los análisis destinado a evaluar la reactividad las superficies funcionalizadas, se ha realizado mediante la incubación de las muestras con FITC, siguiendo el protocolo detallado en el apartado 2.4.6. La presencia de las moléculas enlazadas a los grupos amino se ha detectado por microscopía de fluorescencia. La intensidad de la fluorescencia (IF) se relaciona con la cantidad de grupos amino reactivos en superficie y la distribución de fluorescencia refleja su disposición superficial. Las imágenes de fluorescencia se tomaron con el microscopio confocal, en las siguientes condiciones de medida: Objetivo de 25X, Láser = Iris = 3, Ganancia = 9, Offset = 0.

La figura 4.21 muestra las imágenes obtenidas y la intensidad de fluorescencia calculada a partir del histograma correspondiente. Los resultados muestran que los sustratos funcionalizados a temperatura ambiente son los que presentan una mayor fluorescencia y, por lo tanto, una mayor cantidad de grupos amino reactivos en superficie, tanto en el caso del silicio monocristalino como en el de silicio nanoestructurado, lo que está en concordancia con los resultados que se obtuvieron por FTIR (apartado 4.3.1) y por XPS (apartado 4.3.2). Por otro lado, al comparar los distintos sustratos funcionalizados en idénticas condiciones, se observa que la intensidad de fluorescencia obtenida como consecuencia del proceso de funcionalización a temperatura ambiente es mayor en los sustratos de silicio monocristalino mientras que la intensidad obtenida en los sustratos funcionalizados con aumento de la temperatura de la disolución es del mismo orden. Sin embargo, el porcentaje de grupos amino obtenido por XPS es tres veces mayor en los sustratos de silicio monocristalino calentados durante el proceso que en los de SP_n, de manera que esta diferencia pone de manifiesto la influencia en la reactividad superficial de otras variables diferentes a la concentración.

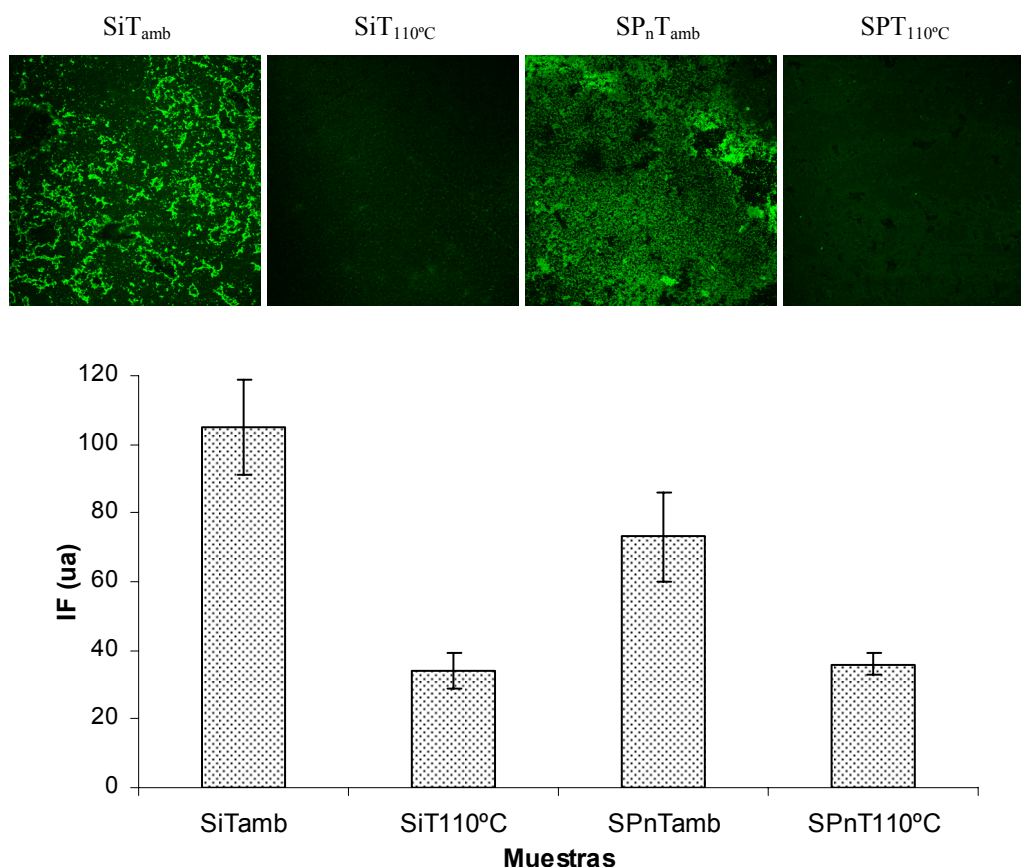


Figura 4.21: Imágenes de confocal e intensidad de fluorescencia (IF) respectiva correspondientes sustratos de silicio monocristalino y nanoestructurado funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente y calentando la disolución durante el proceso.

4.5.2. Absorbancia en el ultravioleta.

El segundo análisis de reactividad superficial se ha realizado empleando 4-nitrobenzaldehído. A la vista de los resultados obtenidos hasta el momento, este análisis se ha realizado sobre sustratos de silicio monocristalino funcionalizados a temperatura ambiente. Sin embargo, este tipo de estudios requiere de sustratos transparentes en el ultravioleta, como es el *fused silica* (FS) (apartado 2.4.7). Por lo tanto, para poder relacionar los resultados obtenidos sobre FS con los obtenidos sobre sustratos de silicio monocristalino se han realizado una serie de estudios previos. En estos estudios se calcula de dos modos distintos la concentración de los grupos amino resultantes tras funcionalizar por inmersión sustratos de FS. En primer lugar, se ha calculado a partir de la medida de la absorbancia de las láminas de FS funcionalizadas y sometidas al proceso de formación de iminas. En segundo, el cálculo de la concentración se ha realizado a partir de las medidas de absorbancia de la disolución resultante del proceso de hidrólisis de las iminas (apartado 2.4.7).

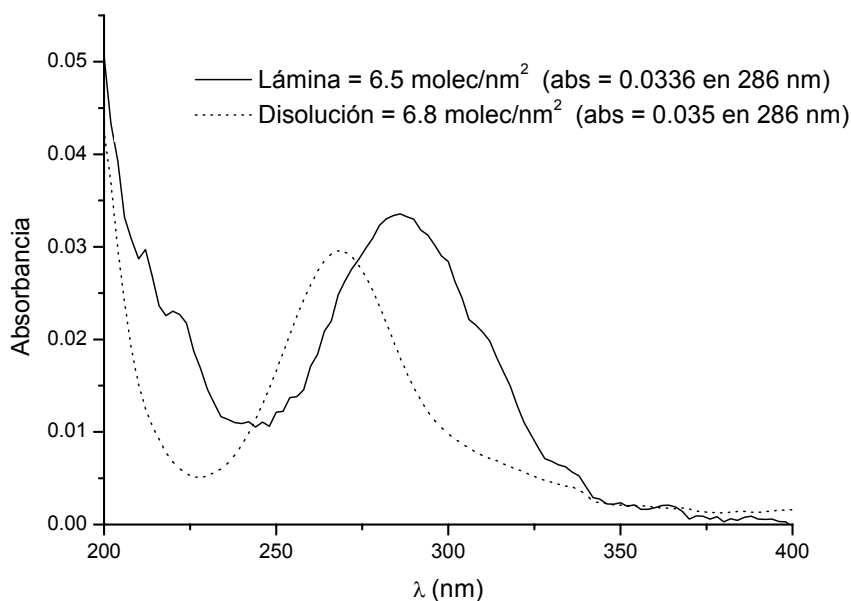


Figura 4.22: Espectros de absorción correspondientes a sustratos de FS (línea continua) y a la disolución resultante de la hidrólisis (línea punteada), referenciadas al sustrato sin derivatizar y a la disolución de ácido acético y agua, respectivamente.

Los espectros de absorción correspondientes a sustratos de FS funcionalizados a temperatura ambiente durante 30 minutos (línea continua) y a la disolución resultante de la hidrólisis de las iminas (línea punteada), se muestran en la figura 4.22. Estos espectros se han medido empleando como referencia la lámina de FS funcionalizada y la disolución de ácido acético y agua (apartado 2.4.7), respectivamente. A partir de los valores de absorción medidos a 286 nm, la concentración de grupos amino (NH_2) obtenida es $6.5 \text{ NH}_2/\text{nm}^2$ para las medidas realizadas en lámina y $6.8 \text{ NH}_2/\text{nm}^2$ en disolución. Se puede concluir que las medidas en disolución dan como resultado los mismos valores que las obtenidas en lámina. Por tanto, se puede extrapolar el método de medida en disolución a los sustratos de silicio monocristalino funcionalizados. El espectro de absorción obtenido en este caso se muestra en la figura 4.23. Se observa que la forma del espectro cambia y que el máximo se desplaza en relación al espectro obtenido para sustratos de FS. Sin embargo, a partir del valor de absorción medido en la longitud de onda 286 nm, la concentración obtenida es $6.1 \text{ NH}_2/\text{nm}^2$. Como se ha comprobado que el error de medida es $1 \text{ NH}_2/\text{nm}^2$, el valor obtenido se puede aceptar dentro del error experimental, y asumir que la eficiencia del proceso es aproximadamente la misma sobre silicio y FS.

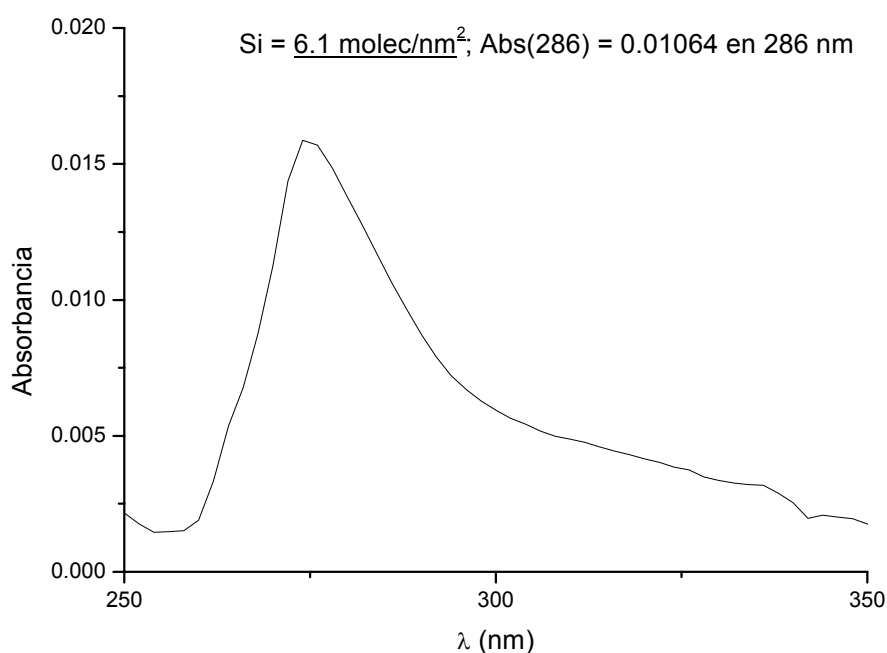


Figura 4.23: Espectro de absorción medido en disolución correspondiente a un sustrato de silicio monocristalino funcionalizado por inmersión a temperatura ambiente.

Otras medidas realizadas por este método muestran que la concentración de grupos amino en sustratos de silicio funcionalizados a temperatura ambiente durante tiempos menores es la siguiente: tras 10 minutos se obtiene una concentración de $2 \text{ NH}_2/\text{nm}^2$, y tras 20 minutos, la concentración es $5 \text{ NH}_2/\text{nm}^2$. Esto concuerda con las observaciones realizadas por SEM (aparato 4.2), que mostraban que tanto el tamaño como el número de los depósitos eran menores cuanto menor era el tiempo de inmersión.

Para finalizar el estudio, se ha establecido una correlación entre los valores de concentración obtenidos por este método y la intensidad de fluorescencia medida por confocal, de forma que se pueden extrapolar los siguientes valores de concentración de grupos amino reactivos en superficie:

- SiT_{amb}: $(6 \pm 1) \text{ NH}_2/\text{nm}^2$.
- SiT_{110°C}: $(2 \pm 1) \text{ NH}_2/\text{nm}^2$.
- SP_n T_{amb}: $(4 \pm 1) \text{ NH}_2/\text{nm}^2$.
- SP_n T_{110°C}: $(2 \pm 1) \text{ NH}_2/\text{nm}^2$.

Estos valores se pueden relacionar con el porcentaje de N en forma de grupos amino obtenido por XPS (tabla 4.7). Si se compara la relación entre las concentraciones obtenidas anteriormente y el porcentaje de N obtenido por XPS, se observa que, aunque el porcentaje de NH_2 es menor en los sustratos de SP_n que en los de silicio monocristalino, los grupos amino son reactivos en mayor proporción, especialmente en el caso de los sustratos funcionalizados con aumento de temperatura de la disolución durante el proceso.

4.6. Sumario.

El proceso de funcionalización por inmersión en disoluciones de APTS en tolueno da como resultado la formación de láminas delgadas de oligómeros (detectadas por AFM) y de estructuras coloidales (detectadas por AFM y SEM), formadas como consecuencia de la hidrólisis y condensación del APTS, así como de la interacción de los grupos NH_2 con los silanoles de otras moléculas de APTS (resultantes del proceso de hidrólisis) y superficiales.

A lo largo de este capítulo, se ha estudiado la influencia de las siguientes variables en las propiedades de dichas estructuras: el tiempo de inmersión, el aumento de temperatura y el tipo de sustrato.

El aumento del tiempo de inmersión produce un aumento en el número y tamaño de las estructuras globulares depositadas, como muestran las imágenes de SEM y AFM. Puesto que estas estructuras son biofuncionales, el aumento del tiempo conlleva un aumento de la concentración de grupos amino funcionales sobre la superficie, como se ha podido comprobar mediante las medidas de la absorbancia en el ultravioleta.

El incremento de temperatura produce la fusión de los coloides entre sí, dando lugar a estructuras con menor volumen asociado. Este hecho se verifica tanto desde el punto de vista de la morfología (SEM), como en los análisis químicos (FTIR y XPS). Estos últimos confirman además que las estructuras obtenidas a temperatura ambiente presentan un mayor grado de polimerización, lo que implica un mayor porcentaje de moléculas de APTS hidrolizadas. Este mayor grado de hidrolización se relaciona a su vez con el número de estructuras siloxano por molécula de APTS a través de las cuales se produce la interacción con la superficie. Los resultados de XPS muestran que dicho

valor es mayor, resultando en una interacción más intensa entre los depósitos y los sustratos, en el caso de las muestras funcionalizadas a temperatura ambiente y en el caso del silicio monocristalino frente al silicio nanoestructurado. Además, el proceso a temperatura ambiente da como resultado una concentración de N superior a la resultante en las muestras obtenidas tras calentar, formando grupos amino (NH_2) en mayor proporción. Los análisis de reactividad superficial confirman que los sustratos funcionalizados a temperatura ambiente tienen el triple y el doble de grupos amino funcionales que los obtenidos tras calentar para los sustratos de silicio monocristalino y silicio nanoestructurado, respectivamente. Al comparar las relaciones obtenidas por XPS y por los análisis de reactividad, se observa que la cantidad de N es menor en los sustratos de silicio nanoestructurado que en los sustratos de silicio monocristalino, pero que los grupos NH_2 son reactivos en mayor proporción.

La influencia de los distintos sustratos empleados: silicio monocristalino y silicio nanoestructurado, se traduce en que la hidrólisis y policondensación del APTS es menor sobre los sustratos de silicio nanoestructurado, dando lugar a un cambio significativamente mayor de la rugosidad superficial. La concentración de N y el porcentaje de éste en forma de grupos amino (NH_2) muestra que el silicio funcionalizado a temperatura ambiente presenta el doble de NH_2 funcionales que el silicio monocristalino, y el triple tras calentar. Sin embargo, los ensayos de reactividad muestran que dichos grupos, aunque menos abundantes, son reactivos en mayor proporción que en el caso de los sustratos de silicio monocristalino. Por otra parte, la estabilidad de la interacción de las estructuras globulares con el sustrato es ligeramente mayor en el caso del silicio monocristalino que en el nanoestructurado.

Como conclusión general, se puede destacar que se han funcionalizado sustratos de silicio monocristalino y silicio nanoestructurado por inmersión en disoluciones de APTS en tolueno, dando como resultado depósitos funcionales, con una interacción con el sustrato estable frente a la fuerza iónica de las disoluciones, y que la concentración de grupos amino es mayor en las muestras funcionalizadas a temperatura ambiente frente a las calentadas y, en los sustratos de silicio monocristalino mayor que en los de nanoestructurado, aunque son más reactivos proporcionalmente en el caso de SP_n , especialmente tras aumentar la temperatura.

4.7 Bibliografía.

-
1. F.J.Boerio, V.H.Wagh, R.G.Dillingham. The Journal of Adhesión 81 (2005), 115-142.
 2. I. Haller. Journal of American Chemical Society 100 (1978), 8050-8055.
 3. E.P. Plueddemann. Silane Coupling Agents. Ed. Plenum Press, New York, 1991.
 4. G.Olofsson, U.Jonsson, M.Malmqvist, I.Ronnerg. Thin Solid Films 124 (1985), 117-123.
 5. P.X. Zhu, Y. Masuda, K.Koumoto. Journal of Colloid and Interface Science 243 (2001) 31-36.
 6. J.H. Moon, J.H.Kim, K.J.Kim, T.H.Kang, B.Kim, C.H.Kim, J.H.Hahn, J.W. Park. Langmuir 13 (1997), 4305-4310.
 7. T. Ogasawara, A. Nara, H. Okabayashi, E. Nishio, C.J. O'Connor. Colloid polymer science 278 (2000) 1070-1084.
 8. D.G.Kurth, T.Bein. Langmuir 11 (1995), 3061-3067.
 9. S.Ek, E.I.Iistola, L. Niistitö. Langmuir 19 (2003), 3461-3471.
 10. D. Losic, M. Cole, H. Thissen, N. H. Voelcker. Surface Science 584 (2005) 245-257
 11. J.L Magalhaes, L.M. Moreira, U.P Rodrigues-Filho, Martha, J Giz, M. A. Pereira-da-Silva, R. Landers, R.C.G.Vinhas P.A.P. Nascente. Surface and Interface Analysis 33, (2002) 293-298.

Capítulo 5

*Biofuncionalización por deposición
química en fase vapor (CVD).*

5.1. Introducción.

En los capítulos anteriores se realizó una caracterización de los sustratos de silicio poroso empleados (capítulo 3) y un estudio de la funcionalización por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno (capítulo 4). A lo largo de este capítulo se muestran los resultados obtenidos al funcionalizar sustratos de silicio monocristalino y silicio poroso (nanoestructurado y macroporoso) empleando técnicas de deposición química en fase vapor (CVD). Como ya se comentó en capítulos anteriores, el empleo de técnicas en fase vapor permite solventar algunos inconvenientes derivados de la falta de control en el proceso de funcionalización en disolución. Sin embargo, mientras que la gran mayoría de las técnicas en fase vapor, se basan en la deshidratación del sustrato y la evaporación del APTS, en las técnicas estudiadas a lo largo de este capítulo, se realiza además la activación del precursor para favorecer su descomposición. Esta descomposición por activación tiene como objetivo ampliar el rango de sustratos que pueden ser funcionalizados por esta técnica, con independencia de su estado químico y sin necesidad de requerir la presencia de grupos hidroxilo ($-OH$) sobre la superficie, lo que supone una diferencia fundamental respecto a las técnicas de funcionalización por inmersión y en fase vapor sin activación del precursor. En el primero de los métodos estudiados la activación del precursor se realiza por plasma (PECVD), empleando un reactor comercial que ya había sido ampliamente estudiado en la deposición de polímeros como la alilamina [1] y precursores metalorgánicos, como el tetraetoxisilano (TEOS, $Si(OC_2H_5)_4$) [2]. La segunda técnica estudiada se basa en la activación térmica del APTS y se lleva a cabo en un reactor que ha sido diseñado y construido en nuestro grupo, de modo que se han realizado las modificaciones necesarias respecto a un CVD convencional, como se explicó en el apartado 2.2.3. El análisis de las películas depositadas por las técnicas de CVD, se realizó desde el punto de vista de las siguientes propiedades:

- Espesor y morfología de las capas, mediante SEM, empleando imágenes en superficie y en sección transversal. La topografía de las superficies se estudió por AFM.
 - Composición química de las películas tanto en volumen como en superficie.
- Con estos análisis se obtiene información de la influencia de los parámetros de funcionalización en la composición química de las películas depositadas, y en

particular, en la presencia de grupos amino en superficie. El análisis en volumen se realizó mediante FTIR y RBS y ERDA y el análisis en superficie mediante XPS.

- Por último, se ha estudiado la reactividad de los grupos amino depositados en la superficie de las muestras biofuncionalizadas por fluorescencia y por absorbancia en el UV. Mediante microscopía confocal, además de la reactividad, se ha evaluado la distribución de los grupos amino en la superficie. La concentración de grupos amino reactivos se realizó a partir de la derivatización con 4-nitrobenzaldehído.

5.2. Estudios preliminares: biofuncionalización por PECVD.

El estudio de los métodos de funcionalización por deposición química en fase vapor se inició con una serie de estudios previos, en los que se empleó un reactor CVD de plasma comercial (PECVD). En primer lugar se ha escogido este tipo de activación, puesto que no requiere el aumento de la temperatura del sustrato y es un proceso rápido y sencillo. Como se explicó en el apartado 2.2.2, con el fin de adaptar el reactor disponible al empleo del APTS, se hicieron algunas modificaciones, en particular la adaptación de un sistema que permitiese evaporar el APTS a temperatura ambiente. Dicho sistema consiste en una red capilar de celulosa a través de la que se hace pasar un flujo de argón.

Los parámetros que controlan el proceso de funcionalización son: la potencia de trabajo del plasma, el flujo de argón del plasma, el flujo de argón de transporte y el tiempo de deposición. Para realizar este estudio el flujo de argón del plasma y el tiempo se han mantenido como parámetros fijos con un valor de 100 sccm y 30 minutos, respectivamente. La potencia de trabajo del plasma (P) se ha variado entre 25-100 W, dejando en algunos casos un valor constante durante el proceso y en otros aumentándolo a intervalos de 10 minutos. Finalmente, el flujo de argón de transporte ($\phi_{Ar,prec}$) se ha variado en el rango 0 - 40 sccm. En todos los casos, se ha empleado silicio monocristalino como sustrato.

Como punto de partida del análisis de las películas, se ha estudiado su espesor a partir de las imágenes de sección transversal obtenidas por SEM. Las capas resultantes son uniformes y tienen un espesor homogéneo a lo largo de la superficie, con valores comprendidos entre 207 nm y 2.1 μ m, para las condiciones de deposición estudiadas.

En particular, la figura 5.1 muestra la imagen correspondiente a una capa obtenida tras 30 minutos de deposición, con una potencia de 100 W y un flujo de argón de arrastre de 40 sccm, depositada sobre un sustrato de silicio monocristalino.

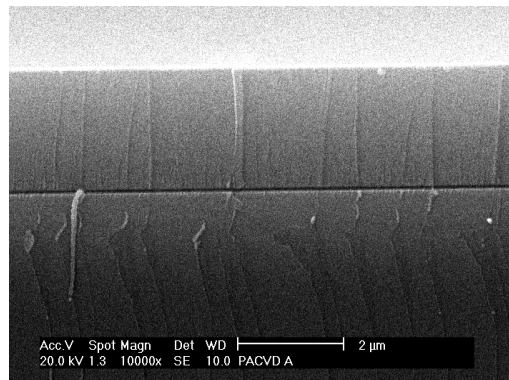


Figura 5.1: Imagen de SEM en sección transversal de un sustrato de silicio monocristalino funcionalizado por PECVD con condiciones: $\phi_{Ar,prec} = 40$ sccm, $P = 100$ W, tiempo = 30 minutos.

A continuación, con el fin de comprobar la eficacia de la red capilar como sistema de evaporación de APTS a temperatura ambiente (apartado 2.2.2), se ha estudiado la composición química, realizando medidas simultáneas de RBS y ERDA (apartado 2.4.4). Para ello se han depositado películas empleando diferentes condiciones de potencia y sin flujo de argón, $\phi_{Ar,prec} = 0$ sccm, de manera que el APTS que llegue a la cámara del reactor procederá únicamente de la evaporación a temperatura ambiente. En la figura 5.2, se muestran los espectros correspondientes a muestras funcionalizadas con $P = 50$ W (izquierda) y 100 W (derecha), respectivamente. En ambos casos, los elementos presentes en las muestras son los correspondientes a la molécula de APTS: Si, O, C, N y H, aunque la intensidad del espectro es mayor en el caso de las muestras depositadas empleando una potencia de plasma de 100 W. Para realizar el ajuste de la composición atómica de las películas se realizaron distintas simulaciones empleando el programa SIMRNA 5.02 (apartado 2.4.4). La simulación que mejor se ajusta a los espectros experimentales se obtiene al suponer que las películas resultantes están compuestas por dos capas. En el caso de las muestras depositadas a $P = 50$ W, la capa más externa tiene un espesor equivalente de $(5.0 \pm 0.2) \times 10^{17}$ at/cm² y una estequiometría SiO₃C₄H₆N y la capa más interna un espesor de $(65 \pm 1) \times 10^{17}$ at/cm² y una estequiometría SiO₂C₄H₆N. En el caso de las películas depositadas a $P = 100$ W, la capa superficial tiene un espesor de $(1.0 \pm 0.2) \times 10^{17}$ at/cm², y la capa más interna de $(15.5 \pm 0.2) \times 10^{17}$ at/cm² y la estequiometría es SiO₃C₈H₁₂N₁₀ y SiO₃C₈H₁₂N,

respectivamente. De acuerdo con estos datos, se comprueba la eficiencia de la red capilar como sistema de evaporación de APTS a temperatura ambiente, como se desprende del hecho de encontrar una capa con una elevada componente orgánica en ambos casos. Por otra parte, estos resultados ponen de manifiesto que la tasa de deposición es mayor al emplear $P = 50$ W mientras que la componente orgánica es mayor al aplicar $P = 100$ W. Esto está en concordancia con la tendencia de deposición de grupos funcionales asociada a la dinámica molecular de un proceso de plasma en el que, para un valor de flujo de precursor, la tasa de incorporación aumenta al disminuir la potencia de descarga del plasma mientras que la fragmentación del precursor aumenta al aumentar la potencia.

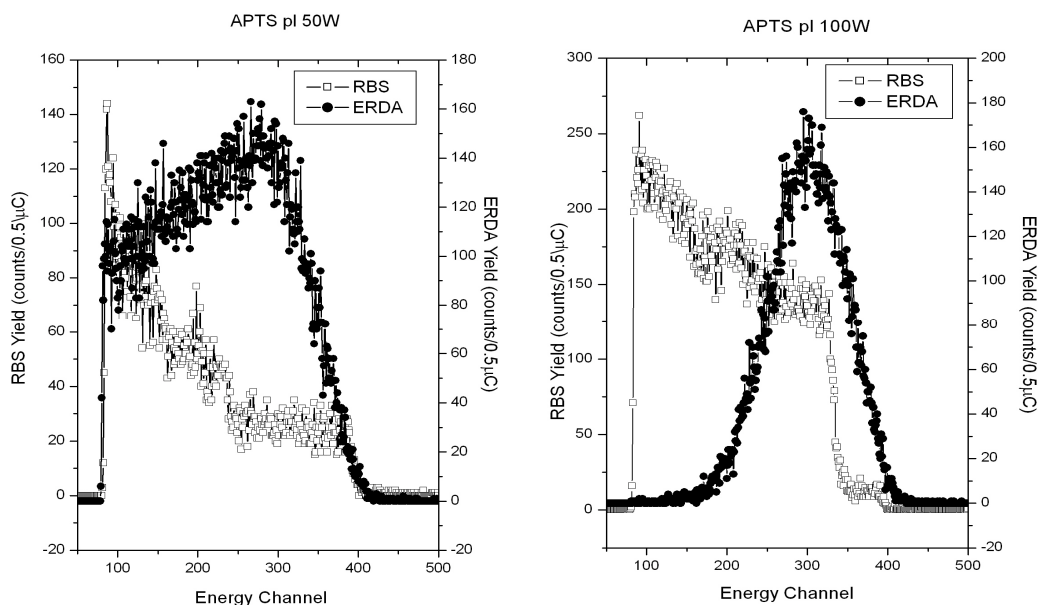


Figura 5.2: Espectros de RBS (cuadrado) y ERDA (círculo) correspondientes a sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por PECVD sin $\phi_{Ar,prec}$ y con condiciones de potencia $P = 50$ W (izda.) y $P = 100$ W (dcha.)

El estudio de los enlaces presentes en las películas obtenidas con las distintas condiciones se realizó por FTIR. La figura 5.3 muestra los espectros obtenidos para los distintos parámetros empleados. Las bandas de absorción presentes en los espectros FTIR son las siguientes: 3280 cm^{-1} (ν_{NH_2}), 2932 y 2875 cm^{-1} (ν_a y ν_s de los CH_2 de la cadena propil, respectivamente); 1550 cm^{-1} y 1670 cm^{-1} (correspondientes δ de aminas secundarias o protonadas y a aminas primarias, respectivamente); 1440 cm^{-1} (δ CH_2 de la cadena propil); 1045 - 1068 y 1120 - 1150 cm^{-1} (Si-O-Si/Si-O-C, del APTS polimerizado, respectivamente) y 790 cm^{-1} (Si-C *rock*). Estas bandas demuestran que,

como resultado del proceso de PECVD, se obtienen películas asociadas a una elevada hidrólisis de las moléculas de APTS, ya que no se encuentran bandas de absorción correspondientes a cadenas etoxi (-OEt). Sin embargo, el grado de polimerización del APTS es menor que el encontrado tras funcionalizar sustratos de silicio monocristalino por inmersión (figura 4.10), como se desprende del hecho de que el doblete 1045-1120 cm^{-1} esté bastante solapado en la mayoría de los casos.

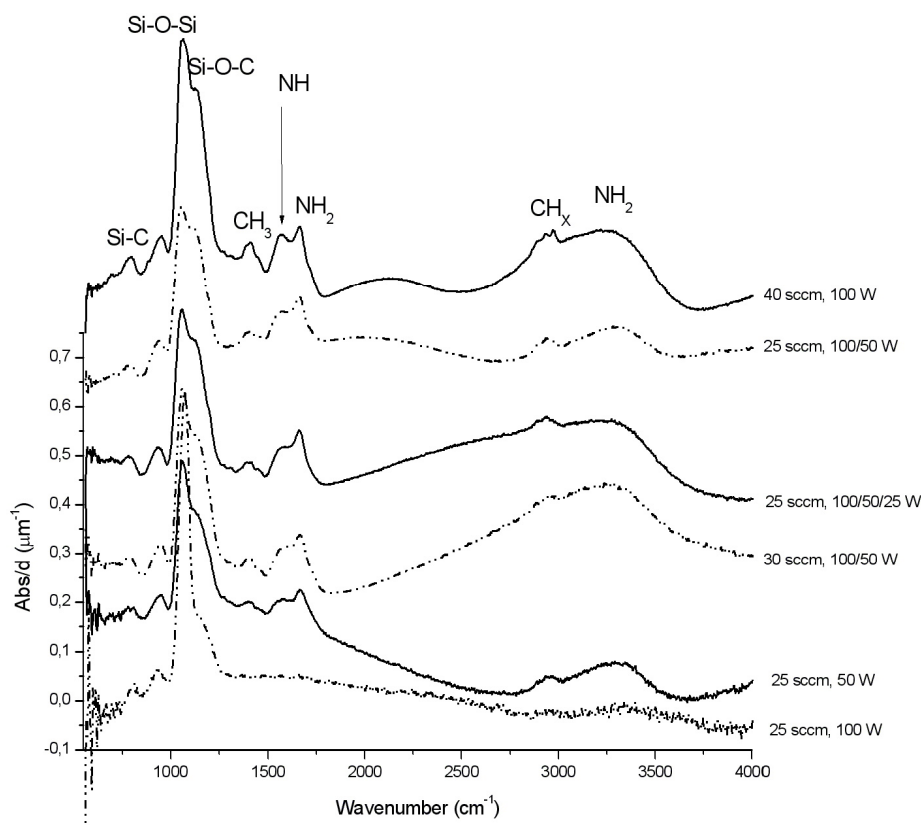


Figura 5.3: Espectros FTIR normalizados al espesor de sustratos de silicio monocristalino funcionalizados mediante PECVD.

Finalmente, para evaluar la biofuncionalidad, determinada por la reactividad de los grupos amino presentes en superficie, las muestras se incubaron con isotiocianato de fluoresceína (FITC, apartado 2.4.6). Las imágenes se han obtenido por microscopía de fluorescencia empleando las siguientes condiciones de medida: rango de verde 0-250 y tiempo de exposición 250 ms. En dichas imágenes se observa una distribución uniforme de los grupos amino sobre la superficie, como indica el hecho de obtener imágenes con una fluorescencia homogénea sobre las superficies. La figura 5.4 muestra una imagen de fluorescencia correspondiente a una muestra obtenida empleando $\phi_{\text{Ar,prec}} = 25 \text{ sccm}$ y potencia variable: 100 W durante 20 minutos y 50 W durante 10 minutos. La imagen

insertada en el ángulo superior izquierdo es el control, que corresponde a un sustrato de silicio monocristalino sin funcionalizar por PECVD e incubado con FITC. El área de cada una de las imágenes es de $340\ \mu\text{m} \times 429\ \mu\text{m}$:

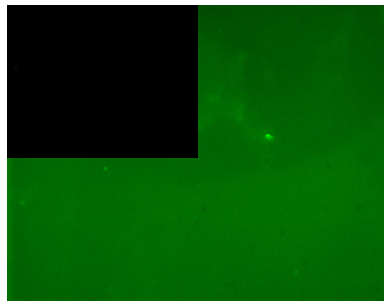


Figura 5.4: Imagen de fluorescencia de la muestra $\phi_{\text{Ar,prec}} = 25\ \text{sccm}$ y $P = 100/50\ \text{W}$ y control de silicio monocristalino (imagen superior izquierda). El área de las imágenes es de $340\ \mu\text{m} \times 429\ \mu\text{m}$.

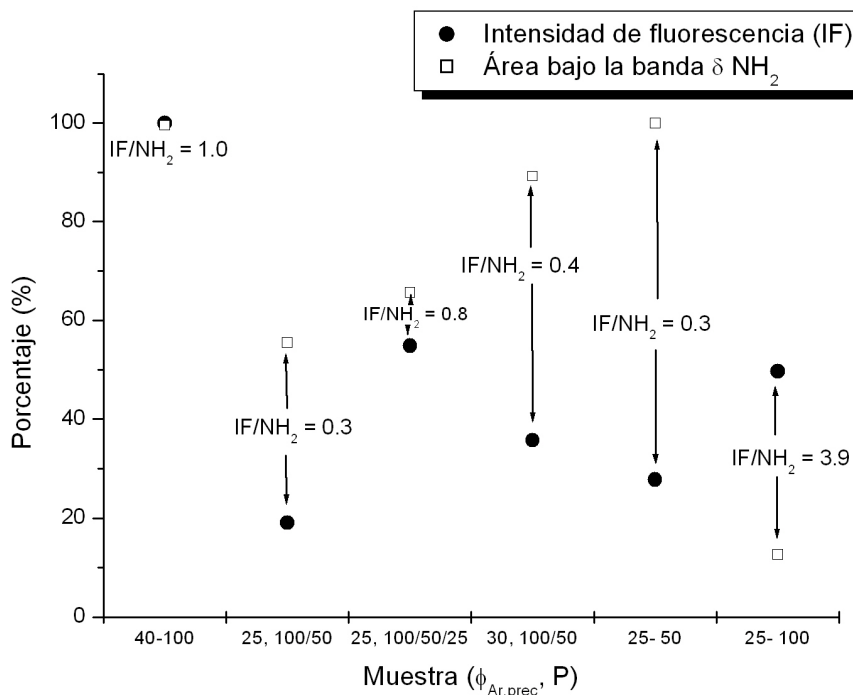


Figura 5.5: Comparación de la intensidad de fluorescencia (IF) y el área de la banda de absorción de grupos amino en FTIR obtenidas para sustratos de silicio monocristalino funcionalizados empleando diversos valores de $\phi_{\text{Ar,prec}}$ y potencia (P).

A continuación, se ha cuantificado la intensidad de fluorescencia de las imágenes obtenidas, empleando el programa ImageJ. Con estos valores, se ha procedido a comparar analíticamente la intensidad de fluorescencia (IF) de las distintas muestras con las áreas de las bandas de absorción de grupos amino obtenidas por FTIR (A_{NH_2}). En la figura 5.5 se muestran los valores de IF y A_{NH_2} (expresados en tanto por ciento

respecto a la muestra más intensa en cada caso) así como el cociente entre ambas magnitudes. Puesto que la IF se relaciona con los grupos amino reactivos presentes en la superficie de las distintas muestras y A_{NH_2} con los grupos amino presentes a lo largo de todo el espesor y con independencia de su reactividad, el cociente entre ambas magnitudes permite realizar una estimación del porcentaje de grupos amino que son funcionales. Así, un valor más alto del cociente $\text{IF}/A_{\text{NH}_2}$, representa que un mayor porcentaje de los grupos amino existentes en la muestra se encuentran en la superficie y son reactivos. De acuerdo con esto, el comportamiento más llamativo corresponde a la muestra obtenida empleando las condiciones $\phi_{\text{Ar,prec}} = 25 \text{ sccm}$ y $P = 100\text{W}$, que presenta una cantidad casi despreciable de grupos amino según los espectros de FTIR, y sin embargo tiene uno de los valores más altos de IF, obteniendo el cociente $\text{IF}/A_{\text{NH}_2}$ más elevado.

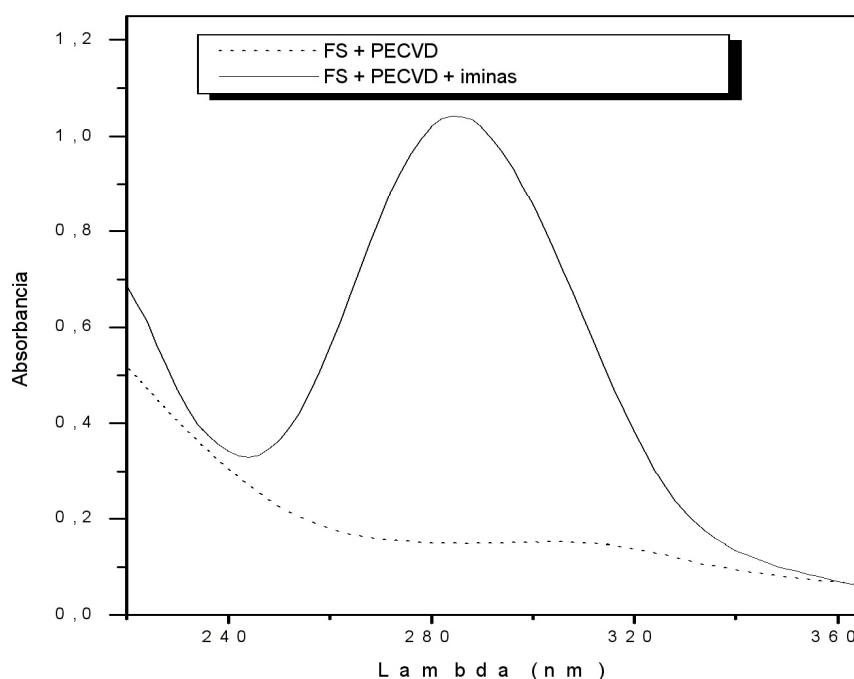


Figura 5.6: Espectros de absorción de las muestras funcionalizadas por PECVD, antes y después del proceso de derivatización con 4-nitrobenzaldehído.

Finalmente, con el fin de cuantificar la concentración de grupos amino en superficie, las muestras se incubaron con 4-nitrobenzaldehído para calcular su concentración a partir de medidas de absorbancia en el ultravioleta (apartado 2.4.7). Los espectros de absorción correspondientes a sustratos de *fused silica* (FS)

fucionalizados por PECVD con condiciones $\phi_{\text{Ar,prec}} = 40$ sccm y $P = 100$ W, antes y después de ser sometidos al proceso de formación de iminas, se muestran en la figura 5.6. La concentración de grupos amino (NH_2) correspondiente da un valor de $446 \text{ NH}_2/\text{nm}^2$, valor muy superior al valor típico de $3 \text{ NH}_2/\text{nm}^2$ encontrados en la bibliografía para películas de APTS depositadas en fase vapor [3, 4]. El motivo por el que se obtiene este valor tan elevado puede deberse bien a que las películas actúan como membranas permeables al nitrobenzaldehído o bien a que las películas se degradan durante el proceso. Para determinarlo, el proceso se estudia en detalle en las películas depositadas por TACVD (apartado 5.3.4.2).

De los resultados anteriores, se puede concluir que mediante PECVD se depositan películas que presentan grupos amino reactivos en superficie y cuya concentración y funcionalidad se puede variar a partir de los parámetros de funcionalización. Sin embargo, estudios posteriores de interacción con sistemas biológicos (capítulo 6) han mostrado que las películas resultantes tienen poca adherencia y se desprenden con facilidad del sustrato sobre el que están depositadas. Por este motivo, se ha pasado a estudiar el efecto de la activación térmica del precursor, que constituye el cuerpo principal de este capítulo.

5.3. Biofuncionalización por TACVD.

La siguiente técnica en fase vapor estudiada es la técnica de TACVD, en la que la activación del APTS se realizó térmicamente. Para llevar a cabo el proceso, se ha diseñado un reactor que permite realizar dicha activación térmica, pero manteniendo los sustratos a temperaturas significativamente menores a la temperatura de trabajo de un CVD, según se explicó en el apartado 2.2.3. Puesto que este reactor ha sido diseñado y fabricado por nuestro grupo, como punto de partida se hicieron una serie de pruebas para comprobar la existencia de capas depositadas y si éstas eran funcionales [5, 6]. Como resultado de esta exploración preliminar, se encontraron unos parámetros, que en adelante se denominan **condiciones de referencia (CR)** y que corresponden a los siguientes valores de los parámetros de deposición: temperatura de evaporación (T_{evap}) = 150°C , temperatura de activación (T_{act}) = 750°C y presión de argón (P_{Ar}) = 1 mbar. En

estas condiciones, las capas depositadas sobre silicio monocristalino recubren completamente la superficie y dan lugar a unas propiedades óptimas de funcionalización, como se verá en el apartado 5.3.4 de reactividad superficial. El estudio sistemático de la influencia de los parámetros de deposición se ha realizado sobre sustratos de silicio monocristalino y silicio poroso, variando los parámetros de funcionalización de uno en uno respecto a las CR. El tiempo de deposición ha sido una de las variables consideradas, si bien la mayoría de los procesos se han llevado a cabo con una duración de 20 minutos dado que este valor del tiempo de deposición da lugar a la formación de películas que recubren completamente la superficie en todos los casos estudiados. Comparando las propiedades de las películas obtenidas sobre silicio monocristalino y silicio poroso, se puede obtener información de la influencia del sustrato en las películas biofuncionales, encontrándose que el TACVD es una técnica muy versátil y relativamente independiente de la química superficial, tal como se planteó en los objetivos de la Tesis.

La presentación de los resultados obtenidos de la caracterización de las películas funcionales, se realiza siguiendo la misma estructura empleada a lo largo del capítulo 4, es decir, en primer lugar se exponen los resultados de la caracterización de las propiedades morfológicas y de la estructura superficial de las películas, a continuación se exponen los resultados de la caracterización química y, por último, las propiedades de funcionalidad. Para cada tipo de análisis, se han evaluado en primer lugar las propiedades obtenidas al funcionalizar los distintos sustratos empleando como condiciones de deposición las CR y después se ha realizado el estudio variando los parámetros de funcionalización.

5.3.1 Análisis morfológico.

Como en capítulos anteriores, el análisis de la morfología de las láminas obtenidas sobre sustratos de silicio monocristalino, nanoestructurado y macroporoso tras ser funcionalizados por TACVD se realizó mediante SEM y AFM. A partir de las imágenes de SEM se obtiene información sobre la uniformidad de las películas funcionales, así como sobre su espesor mediante las imágenes en sección transversal, y

a partir de las imágenes de AFM se obtiene información sobre la topografía y la morfología superficial a escala nanométrica.

5.3.1.1. Propiedades de las capas obtenidas en condiciones de referencia (CR).

Como punto de partida de la caracterización morfológica, se analizaron las propiedades de las películas resultantes sobre **sustratos de silicio monocristalino** funcionalizados en condiciones de referencia (CR: $T_{\text{evap}} = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{act}} = 750\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P_{\text{Ar}} = 1\text{ mbar}$) durante 20 minutos. La figura 5.7 muestra la imagen correspondiente, obtenida por SEM en sección transversal. Las películas resultantes cubren completamente la superficie, con un espesor de $4\text{ }\mu\text{m}$, uniforme a lo largo de la misma.

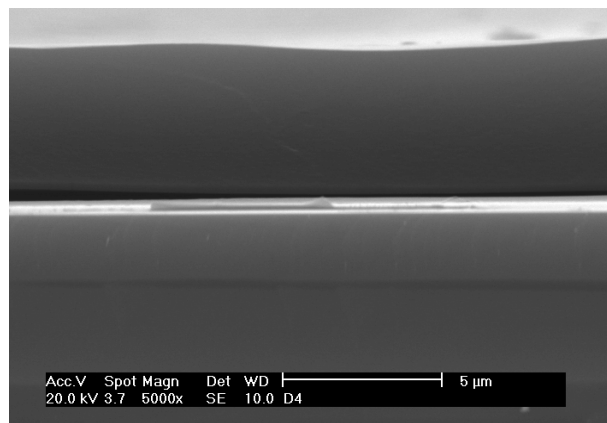


Figura 5.7: Imagen de SEM correspondiente a un sustrato de silicio monocristalino funcionalizado por TACVD en condiciones de referencia durante 20 min.

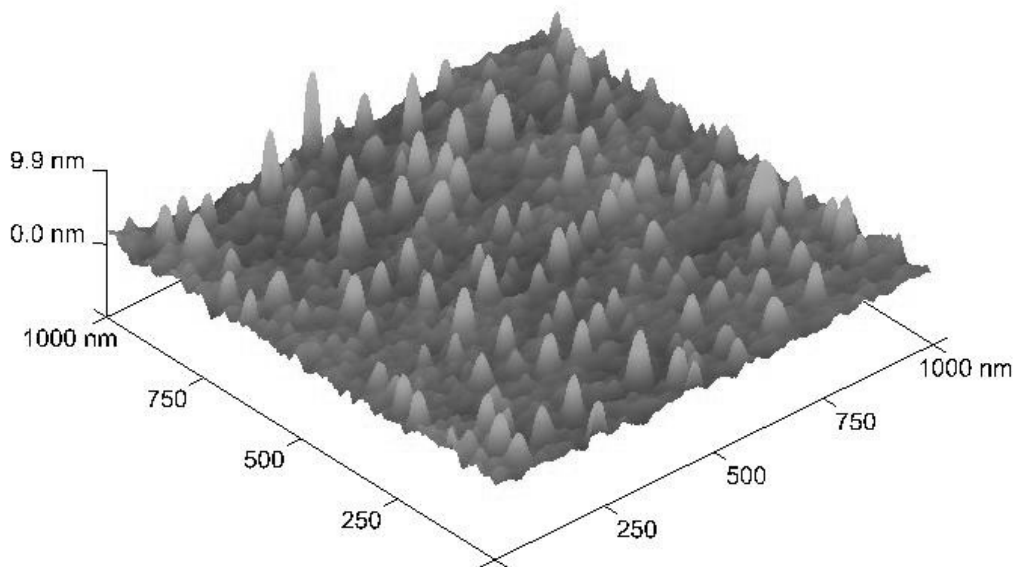


Figura 5.8: Imagen de AFM correspondiente a un sustrato de silicio monocristalino funcionalizado por TACVD en condiciones de referencia durante 20 min.

El análisis de la topografía, realizado por AFM se muestra en la figura 5.8. En la imagen se observa que la película obtenida presenta una distribución de granos sobre la superficie, con un tamaño medio de 51 nm y una altura media de 6.5 nm. La rugosidad RMS es $1.17 \text{ nm} \pm 0.08 \text{ nm}$. A diferencia de la topografía de las películas resultantes tras el proceso de inmersión (figura 4.7), mediante TACVD la distribución de los granos sobre la superficie es mucho más uniforme y éstos presentan menor dispersión en el tamaño.

A continuación se han estudiado las películas funcionales resultantes sobre **silicio nanoestructurado (SP_n)** funcionalizado en condiciones de referencia. La figura 5.9 muestra la imagen de SEM en sección transversal correspondiente. Como en el caso del silicio monocristalino, las películas recubren completamente la superficie con un espesor uniforme a lo largo de la misma de 1 μm , esto es, menor que el espesor de las películas obtenidas sobre los sustratos de silicio monocristalino en las mismas condiciones de funcionalización.

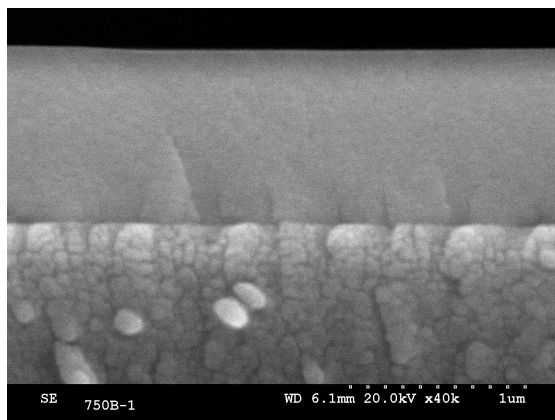


Figura 5.9: Imagen de SEM correspondiente a un sustrato de silicio nanoestructurado funcionalizado por TACVD en condiciones de referencia durante 20 min.

La topografía de la superficie obtenida por AFM (figura 5.10) es significativamente diferente de la obtenida en los sustratos de silicio monocristalino, pues no se observan estructuras de grano sobre la superficie. La rugosidad RMS es $(0.44 \pm 0.05) \text{ nm}$, es decir, menor que la rugosidad del propio sustrato, que era $(0.97 \pm 0.05) \text{ nm}$, como se vio en el apartado 3.2.1, lo que significa que las películas no reproducen la estructura porosa del silicio nanoestructurado. La rugosidad también es menor que la medida en las películas depositadas sobre silicio monocristalino debido a

que no se aprecia la formación de las estructuras granuladas que se encontraron sobre silicio. Por otro lado, también se observan diferencias respecto a la topografía encontrada tras el proceso de inmersión (figura 4.8), en la que la rugosidad superficial aumentaba considerablemente respecto a la del sustrato sin funcionalizar, aun en las zonas exentas de coloides.

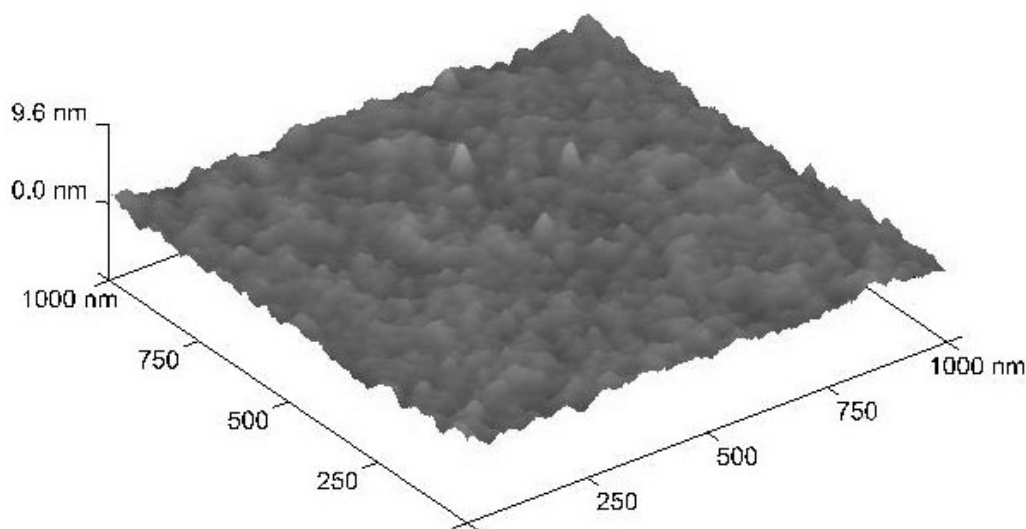


Figura 5.10: Imagen de AFM correspondiente a un sustrato de silicio nanoestructurado funcionalizado por TACVD en condiciones de referencia durante 20 min.

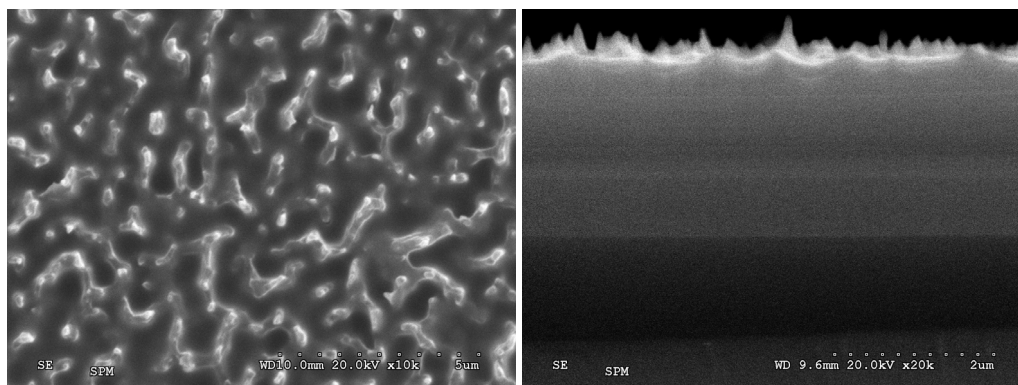


Figura 5.11: Imágenes de SEM en superficie y sección transversal de un sustrato de silicio macroporoso funcionalizado por TACVD en condiciones de referencia durante 20 min.

Para finalizar el estudio de la morfología de las películas obtenidas en condiciones de referencia, se han funcionalizado **sustratos de silicio macroporoso** (figura 5.11). Las imágenes muestran una superficie irregular y capas resultantes en las que no se puede determinar con exactitud el espesor. No obstante, aunque estos resultados puedan parecer en una primera impresión relativamente negativos, estas películas presentan unas propiedades óptimas de reactividad superficial (apartado 5.3.4.1) así como de interacción con sistemas biológicos (apartados 6.4).

5.3.1.2. Influencia de los parámetros de funcionalización.

Una vez caracterizadas las propiedades de las películas obtenidas en condiciones de referencia sobre sustratos de silicio monocristalino, nanoestructurado y macroporoso, se ha estudiado la influencia de la variación de los parámetros de funcionalización. Este estudio se ha centrado en la determinación de la uniformidad y el espesor de las capas resultantes.

Para comenzar, se ha variado la **temperatura de activación**, en el rango 650-800 °C, cada 50°C, dejando el resto de condiciones fijas a los valores correspondientes a las condiciones de referencia: $T_{\text{evap}} = 150$ °C y $P_{\text{Ar}} = 1$ mbar, y con un tiempo de funcionalización de 20 minutos. En la figura 5.12, se muestran las imágenes de SEM en sección transversal correspondientes a sustratos de silicio monocristalino. Como se observa al comparar los distintos espesores, la tasa de deposición aumenta con la temperatura de activación. Las películas resultantes son homogéneas y planas, salvo en el caso de 800°C, temperatura a la cual las capas se resquebrajan debido a que el espesor (8µm) rebasa el valor crítico y la película se rompe y se levanta, como se observa en las imágenes de SEM.

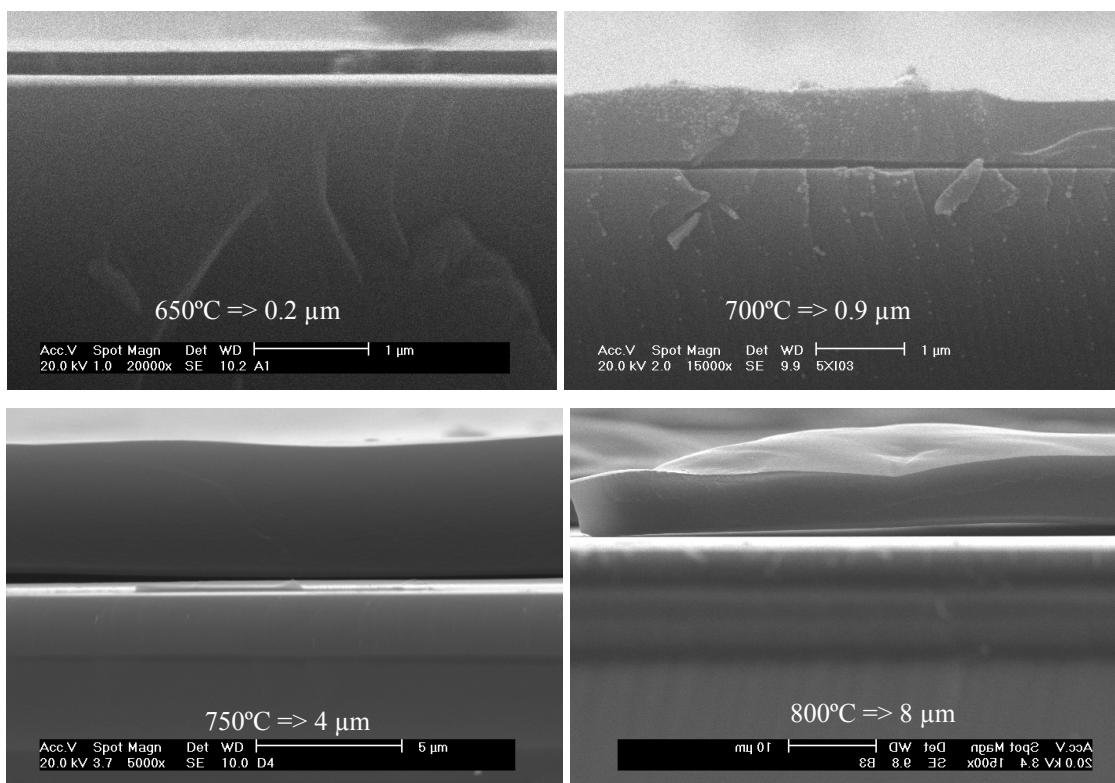


Figura 5.12: Imágenes de SEM en sección transversal de sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD con diferentes temperaturas de activación del APTS.

A continuación, se ha estudiado la influencia de la **temperatura de evaporación**, en el intervalo 130-190°C, tomando valores cada 20°C, con el resto de parámetros fijos a las condiciones de referencia: $T_{act} = 750\text{ °C}$ y $P_{Ar} = 1\text{ mbar}$, durante 20 minutos. La figura 5.13 muestra las imágenes de SEM obtenidas para los sustratos de silicio funcionalizados con dichas condiciones. Estas imágenes muestran que la variación de la temperatura de evaporación para $T_{evap} \leq 170\text{ °C}$ da lugar a películas con un espesor creciente con la temperatura y que son, en todos los casos, planas y homogéneas. Sin embargo, a partir de 170°C, se observa una disminución del espesor al aumentar la temperatura de evaporación y además, para $T_{evap} = 190\text{ °C}$, las películas obtenidas dejan de ser planas y se forman ondulaciones sobre la superficie. Este tipo de estructuras, que también se forman con otros parámetros, se estudiarán con más detalle en el apartado 5.3.1.3.

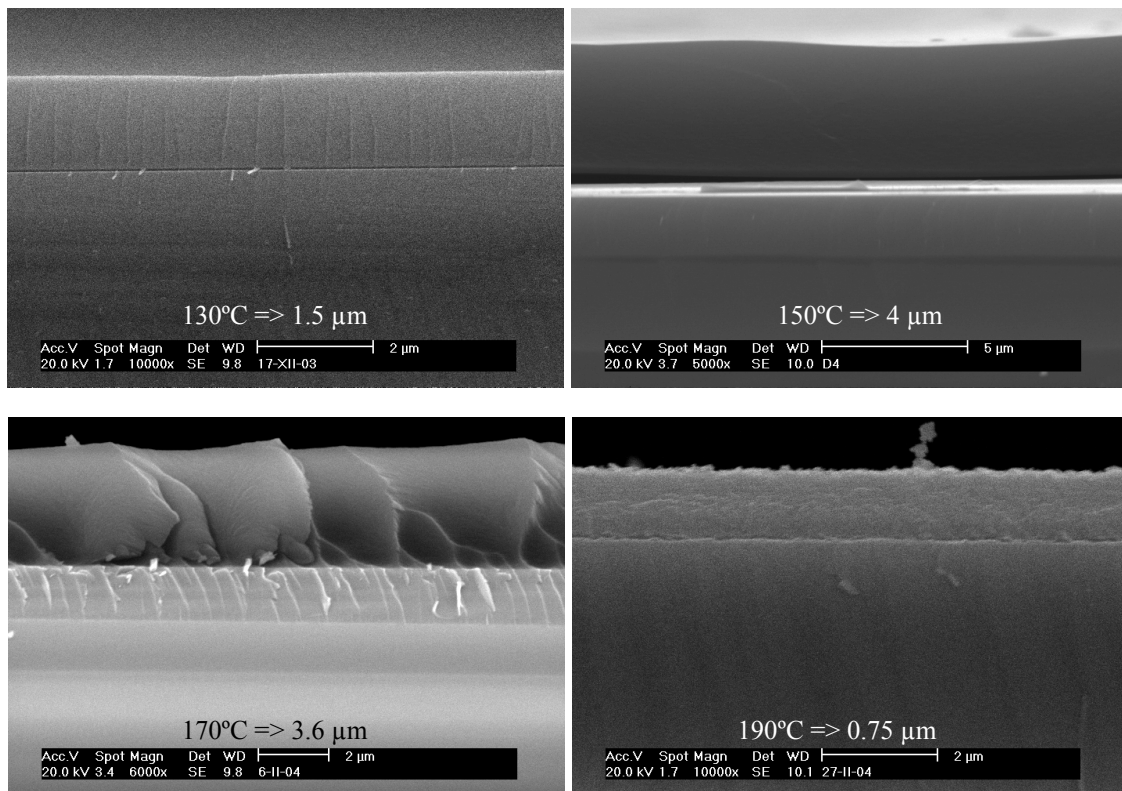


Figura 5.13: Imágenes de SEM en sección transversal de sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD con diferentes temperaturas de evaporación del APTS.

Por último, la influencia de la **presión de argón**, se ha estudiado en el intervalo 0.1 - 4 mbar. Las imágenes de SEM obtenidas (figura 5.14) muestran que al aumentar la presión de argón (P_{Ar}) se observan dos tipos de comportamiento, dependiendo de que la presión empleada sea menor o mayor que 2 mbar. Para $P_{Ar} < 2\text{ mbar}$, el espesor de las

capas aumenta con la presión y las capas resultantes son homogéneas y planas. Sin embargo, para $P_{Ar} \geq 2$ mbar, el espesor disminuye al aumentar la presión y las capas depositadas dejan de ser planas, presentando estructuras onduladas sobre la superficie, similares a las que se observaron en el caso $T_{evap} = 190^\circ\text{C}$.

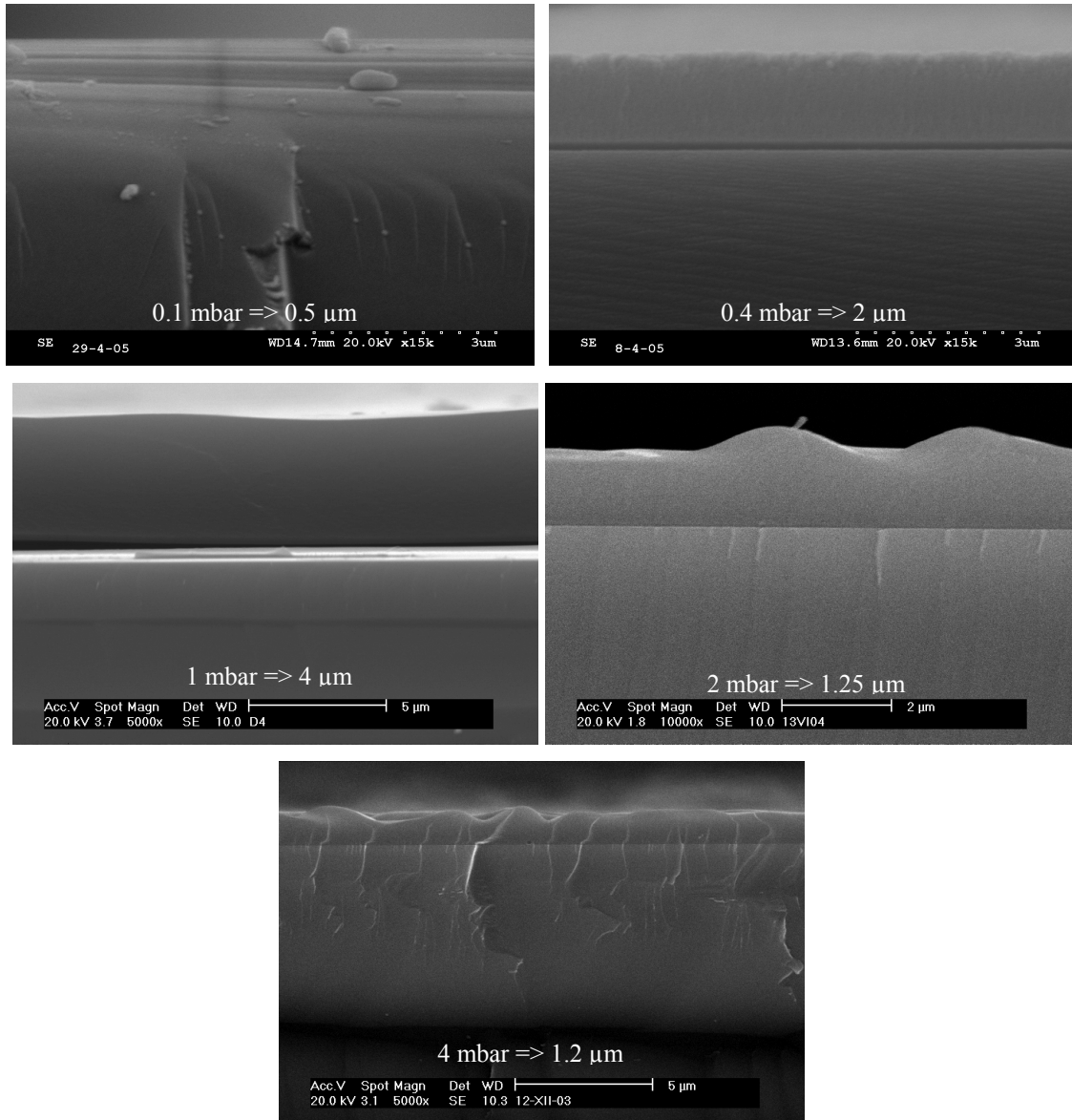


Figura 5.14: Imágenes de SEM en sección transversal de sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD con diferentes presiones de argón.

Este cambio de comportamiento observado para $P_{Ar} = 2$ mbar, podría explicarse en términos de un cambio en el régimen molecular del gas formado por el APTS evaporado junto con el gas de arrastre en el reactor de TACVD. Mientras que para $P_{Ar} > 1$ mbar, el número de Knudsen [7, 8] es menor o igual a 0.01, lo que se corresponde con un régimen laminar del flujo, para valores inferiores de presión el número de Knudsen

es mayor que 0.01, lo que corresponde a un flujo en el régimen de transición entre laminar y molecular. Este mismo efecto de cambio del régimen molecular del flujo se podría estar produciendo al aumentar la temperatura de evaporación por encima de 150°C, ya que un aumento en la temperatura de evaporación equivale a un aumento del flujo del vapor de APTS.

Una de las modificaciones realizadas en el reactor fue la de separar la cámara de activación del APTS y la cámara de deposición en la que se sitúan los sustratos (apartado 2.2.3) para asegurar que la temperatura de los mismos fuese considerablemente inferior a la de activación. Para comprobar este supuesto, se ha medido la temperatura del sustrato durante el proceso de funcionalización empleando diversos parámetros. La temperatura del sustrato antes de hacer pasar el flujo de APTS y argón nunca supera los 40°C para los distintos valores de los parámetros de funcionalización estudiados. Al hacer pasar el flujo del gas, la temperatura del sustrato aumenta aunque sin llegar a sobrepasar 80°C en ningún caso tras 20 minutos de deposición. De lo anterior se desprende que los sustratos se calientan esencialmente por efecto del flujo de APTS + argón y que su temperatura se mantiene muy por debajo de la temperatura de activación y por debajo incluso de las temperaturas empleadas en los métodos de evaporación de APTS, que son entre 100 y 150°C [9, 10].

Por último, se ha variado el **tiempo de deposición**, fijando el resto de parámetros a los valores correspondientes a CR, para estudiar el mecanismo de crecimiento de las películas. Con este fin, se obtuvieron imágenes de SEM tanto en superficie como en sección transversal. Las imágenes de SEM correspondientes a las muestras depositadas durante 20 minutos se muestran en la figura 5.15. La figura 5.15 A muestra una imagen tomada con electrones generados con una diferencia de potencial de 20KV, en la que se observa una capa de espesor uniforme que recubre completamente la superficie, distinguiéndose zonas claras y oscuras. Sin embargo, al hacer incidir electrones con menor aceleración (5KV) y, por tanto de menor penetración, las zonas oscuras anteriormente observadas, aparecen ahora como zonas elevadas (figura 5.15, B), aunque esta diferencia de espesor no se aprecie en las imágenes en sección transversal (figura 5.15, C), en las que el espesor es uniforme. El tamaño de los núcleos observados presenta una gran dispersión de áreas, con valores que oscilan entre 25 y 2600 μm^2 .

Al reducir el tiempo de funcionalización a 10 minutos, se distingue el patrón de islas de crecimiento, en todas las condiciones de medida (figura 5.16) lo que significa que el espesor que presentan los núcleos obtenidos tras 10 minutos es mayor y que se va suavizando al aumentar el espesor de las capas. Además, los núcleos obtenidos presentan una menor dispersión de tamaños, con un valor medio de $32 \mu\text{m}^2$.

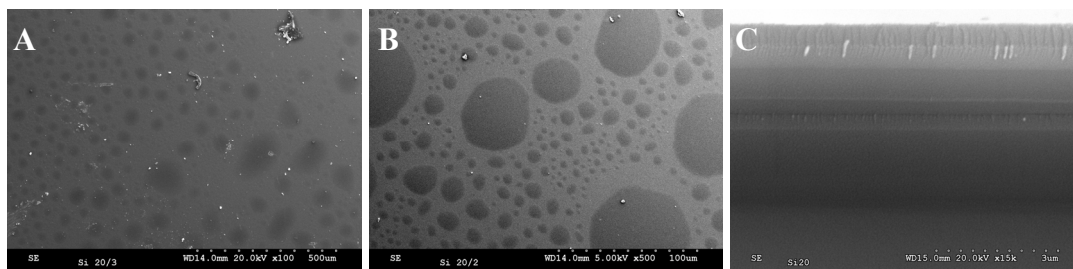


Figura 5.15: Imágenes de SEM en superficie (A y B) y en sección transversal (C), de sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD en CR durante 20 minutos. La imagen A se ha tomado con electrones de 20 KV y la B con electrones de 5 KV.

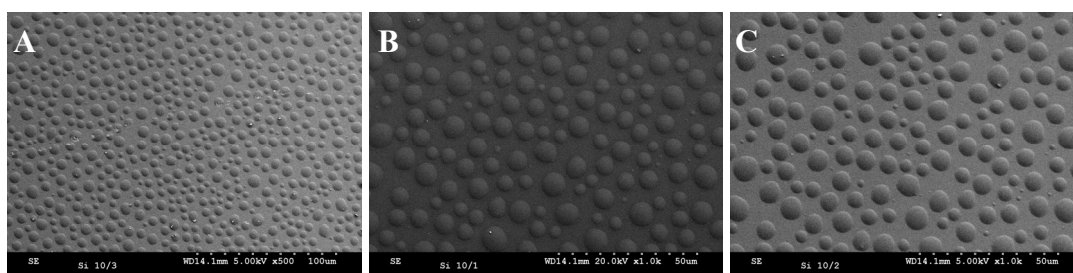


Figura 5.16: Imágenes de SEM en superficie de sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD en condiciones de referencia durante 10 minutos. La imagen (A) se ha tomado con electrones de 20 KV y (B y C) con electrones de 5 KV.

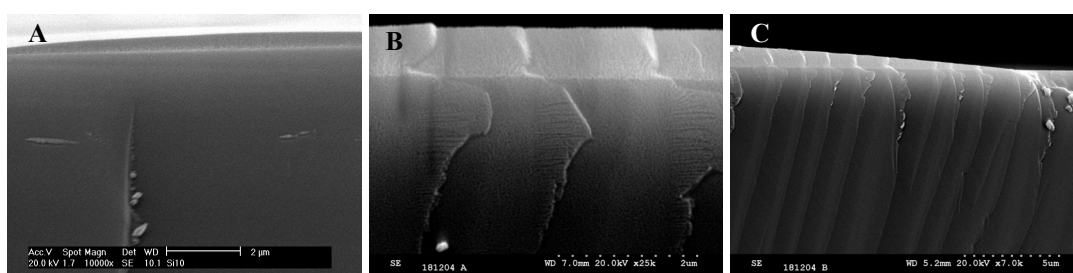


Figura 5.17: Imágenes de SEM, en sección transversal, de sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD en condiciones de referencia durante 10 minutos.

Las imágenes en sección transversal correspondientes a las muestras funcionalizadas durante 10 minutos (figura 5.17) reproducen la variación de espesor asociada a los núcleos de crecimiento, encontrado un perfil de espesores que comprende desde zonas sin material depositado hasta otras con un espesor máximo de $0.7 \mu\text{m}$. A

diferencia de lo observado en la muestra funcionalizada durante 20 minutos, tras 10 minutos no llega a formarse una capa que recubra completamente la superficie.

Para finalizar el análisis de la influencia del tiempo, se han estudiado las películas obtenidas sobre silicio monocristalino tras 5 minutos de funcionalización. Las imágenes de SEM en superficie correspondientes (figura 5.18) muestran la presencia de núcleos de crecimiento con un tamaño medio de $29 \mu\text{m}^2$, que presentan un espesor asociado tan pequeño que no llega a distinguirse en las observaciones realizadas por SEM en sección transversal.

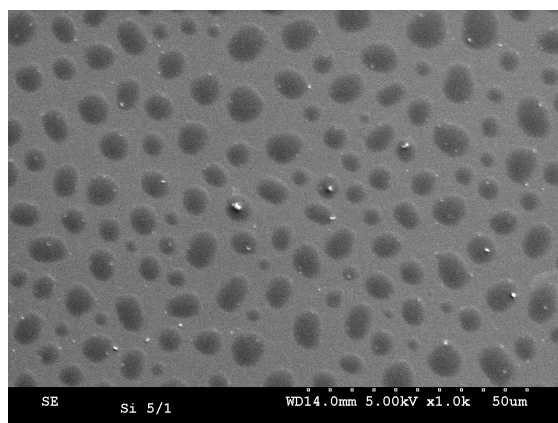


Figura 5.18: Imagen de SEM correspondiente a un sustrato de silicio monocristalino funcionalizado por TACVD en condiciones de referencia durante 5 minutos.

En resumen, se ha observado que al disminuir el tiempo de deposición se produce una disminución del espesor y, en lugar de capas completas, se encuentran núcleos de crecimiento con tamaño y espesor menores. De acuerdo a todo esto, se puede asumir un modelo de crecimiento de capas de tipo Volver-Weber [11] en el que los átomos que llegan a la superficie con baja energía, se difunden por ella e interaccionan entre sí formando pequeños núcleos a partir de los cuales se inicia el crecimiento de las películas.

A continuación, se ha repetido el mismo estudio sobre **sustratos de silicio nanoestructurado (SP_n)**. Como en el caso del silicio monocristalino, el estudio se ha realizado estudiando en primer lugar la influencia de la **temperatura activación**. La figura 5.18 muestra las imágenes de SEM en sección transversal de los sustratos de SP_n funcionalizados durante 20 minutos con temperaturas de activación comprendidas entre 650 y 800°C, dejando el resto de condiciones fijas: $T_{\text{evap}} = 150^\circ\text{C}$, y $P_{\text{Ar}} = 1 \text{ mbar}$. A partir de las imágenes de la figura 5.19, se observa que apenas se llega a formar una

película sobre la superficie del silicio nanoestructurado para 650°C, encontrándose estructuras similares a los coloides formados por inmersión (apartado 4.2), mientras que las capas recubren completamente la superficie y son homogéneas y planas para temperaturas superiores a 650°C. Las películas presentan un espesor creciente con la temperatura de activación en todo el rango estudiado.

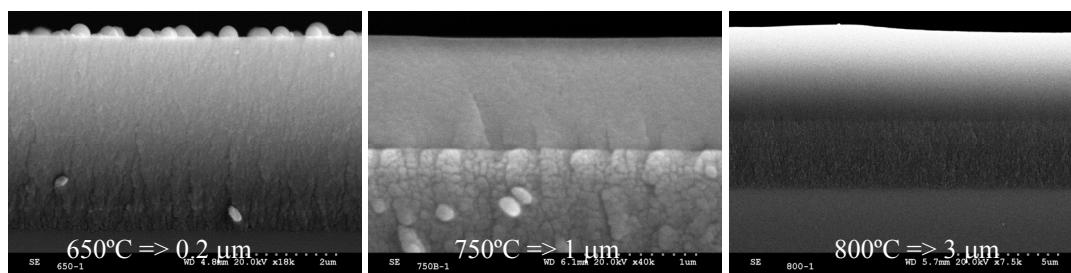


Figura 5.19: Imágenes de SEM en sección transversal de sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD con diferentes temperaturas de activación del APTS.

Si se compara la variación de espesor de las películas en función de la temperatura de activación para sustratos de silicio monocristalino y sustratos de silicio nanoestructurado, se observa que la tasa de deposición es menor en estos últimos. Esta diferencia se observa de forma sistemática al variar los distintos parámetros de funcionalización. Una posible explicación puede relacionarse con la rugosidad superficial del sustrato y el modelo de crecimiento de películas propuesto, de manera que la topografía del silicio nanoestructurado dificulta el proceso de difusión y formación de núcleos de los átomos que llegan a la superficie con baja energía en mayor medida que la superficie del silicio monocristalino.

La influencia de la **temperatura de evaporación** en las películas depositadas sobre silicio nanoestructurado se estudió en el rango 130-190°C, con el resto de los parámetros fijos: $T_{act} = 750\text{ °C}$ y $P_{Ar} = 1\text{ mbar}$, durante 20 min. Las imágenes de SEM (figura 5.20) muestran que las capas obtenidas son planas y homogéneas, recubren completamente la superficie del silicio nanoestructurado en todo el rango estudiado y no se observan las ondulaciones presentes en las muestras crecidas sobre silicio monocristalino con $T_{evap} = 190\text{ °C}$ (figura 5.13). Como se ha observado al variar la temperatura de activación, el espesor de las películas es menor sobre SP_n que sobre silicio monocristalino para las mismas condiciones de funcionalización. Sin embargo, la disminución de la tasa de deposición observada en silicio monocristalino para $T_{evap} >$

150°C, es ahora mucho más suave, obteniéndose un espesor prácticamente constante al aumentar la temperatura por encima de 150°C.

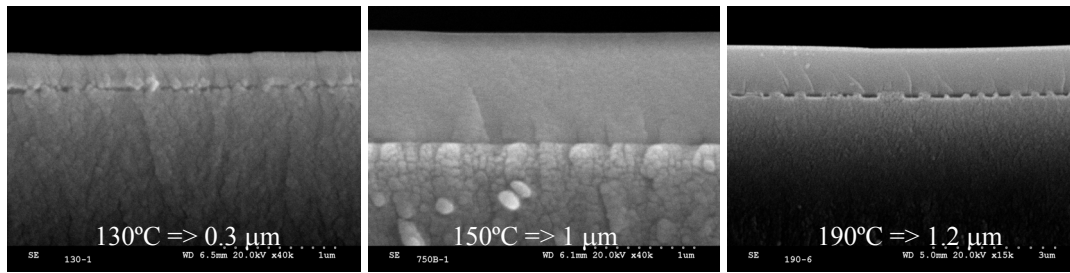


Figura 5.20: Imágenes de SEM en sección transversal de sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD con diferentes temperaturas de evaporación de APTS.

Por último, se ha evaluado la influencia de **la presión del gas de arrastre**. En este caso, se ha tomado como presión máxima 1 mbar tras comprobar que las propiedades de las películas empeoraban por encima de dicho valor para los sustratos de silicio monocristalino. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.21. Las películas resultantes son planas y de espesor uniforme. Sin embargo, al comparar los espesores resultantes sobre silicio monocristalino y nanoestructurado, se observa que el espesor es mayor sobre SP_n para P_{Ar} = 0.4 mbar, a diferencia de lo observado en todos los demás casos.

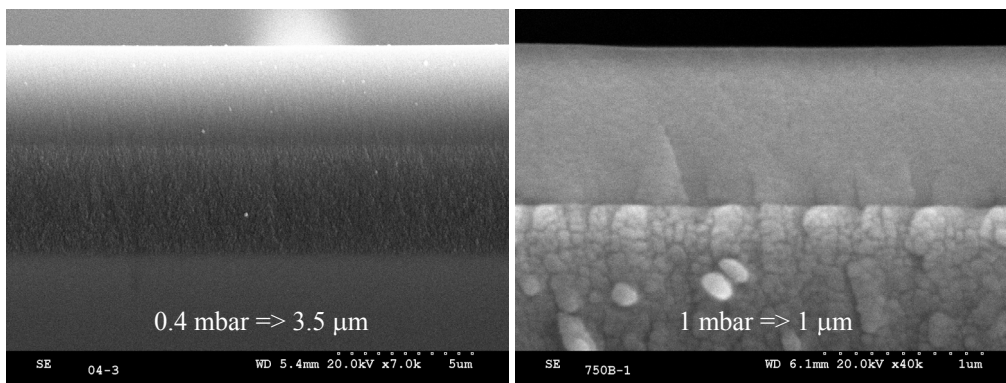


Figura 5.21: Imágenes de SEM en sección transversal de sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD con diferentes presiones de argón.

En resumen, la funcionalización por TACVD da como resultado la deposición de películas de espesor uniforme, tanto sobre silicio monocristalino como sobre silicio nanoestructurado, aunque en general la tasa de deposición es menor sobre SP_n. El estudio de la influencia de los parámetros que intervienen en el proceso de funcionalización muestra que la tasa de deposición aumenta con la temperatura de activación. Sin embargo, al variar los parámetros relacionados con el flujo de moléculas

de APTS, esto es temperatura de evaporación y presión de argón, se han observado dos tendencias de comportamiento distintas, dependiendo de que el valor esté por encima o por debajo del correspondiente a las condiciones de referencia. Por debajo de dicho valor, la tasa de deposición aumenta con el parámetro correspondiente, y para valores superiores disminuye, lo que podría explicarse en función de un cambio en el régimen molecular.

5.3.1.3. Estructuras especiales: laberintos y estrías.

Como se ha visto en el apartado anterior, las películas funcionales resultantes del proceso de TACVD son planas y homogéneas en la mayoría de los casos estudiados. Sin embargo, las capas obtenidas sobre sustratos de silicio monocristalino en determinadas condiciones de funcionalización, dan lugar a la formación de estructuras onduladas. En particular, las imágenes de la figura 5.22 corresponden a sustratos de silicio monocristalino funcionalizados en condiciones: $T_{\text{evap}} = 190\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{act}} = 750\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P_{\text{Ar}} = 1\text{ mbar}$, $t = 20\text{ min}$. Otras condiciones en las que se han observado estas estructuras son: $T_{\text{evap}} = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{act}} = 750\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P_{\text{Ar}} = 4\text{ mbar}$, $t = 20\text{ min}$. Las condiciones de funcionalización corresponden en ambos casos con un aumento en el número de moléculas de APTS que llegan al horno de activación.

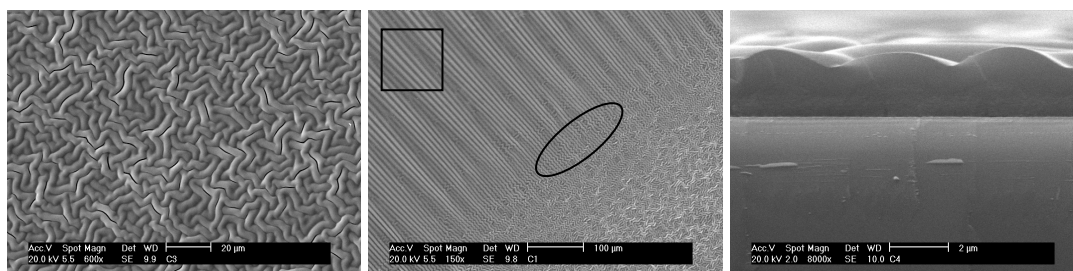


Figura 5.22: Imágenes de SEM en superficie de sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD en condiciones: $T_{\text{evap}} = 190^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{act}} = 750^{\circ}\text{C}$, $P_{\text{Ar}} = 1\text{ mbar}$, $t = 20\text{ min}$.

En la bibliografía, estas estructuras se explican como resultado del ordenamiento de sistemas diversos que tienen como punto en común encontrarse en fase fundida. Algunos ejemplos de los sistemas anteriores son los copolímeros, formados por cadenas de dos tipos de monómeros unidos covalentemente entre sí [12], cristales líquidos en fase esméctica [13], compuestos ternarios en los que el surfactante constituye la interfase entre agua y aceite [14] o mezclas binarias químicamente reactivas [15]. El caso que nos ocupa, la técnica de biofuncionalización por TACVD, podría

corresponderse con el de copolímeros y, especialmente, con el de mezclas binarias químicamente reactivas. En ambos casos, los dos tipos de componentes se formarían como subproductos de la descomposición del APTS como consecuencia de su activación térmica.

Estas estructuras se ordenan en tres tipos de dominios: pliegues aleatoriamente orientados o **laberintos** (figura 5.22, izda), surcos rectos o **estrías** (figura 5.22, zona dentro del cuadrado) y la zona de transición entre ambos que presentan una morfología de surcos en **zig-zag** (figura 5.22, zona dentro de la elipse).

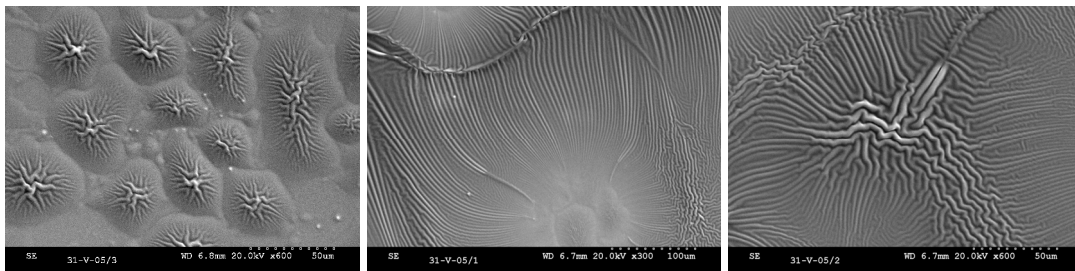


Figura 5.23: Imágenes de SEM en superficie de sustratos de silicio funcionalizados por TACVD en condiciones: $T_{\text{evap}} = 190^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{act}} = 750^{\circ}\text{C}$, $P_{\text{Ar}} = 1\text{mbar}$, $t = 15\text{min}$.

Las estructuras obtenidas empleando los valores de los parámetros de funcionalización anteriores, $T_{\text{evap}} = 190^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{act}} = 750^{\circ}\text{C}$, $P_{\text{Ar}} = 1\text{mbar}$, pero con un tiempo de funcionalización de 15 minutos, o bien las condiciones: $T_{\text{evap}} = 150^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{act}} = 750^{\circ}\text{C}$, $P_{\text{Ar}} = 4\text{mbar}$, $t = 20\text{min}$, se muestran en la figura 5.23. Estas estructuras corresponden a patrones de laberintos, estrías y zig-zag en un estadio de formación anterior. Es interesante destacar que estas estructuras se empiezan a formar a partir de los núcleos de crecimiento descritos con anterioridad, en forma de zig-zag, a partir de las cuales se forman los laberintos. En las zonas más alejadas a dichos núcleos, las estructuras forman estrías que convergen a las zonas que marcan la separación entre los distintos dominios de ordenación.

El estudio de estas estructuras por AFM (figura 5.24), muestra que su rugosidad RMS está comprendida entre 11 y 26 nm, dependiendo de que la zona analizada esté más o menos próxima a los núcleos de crecimiento. Estas diferencias en la rugosidad se deben a que el patrón que presentan las estructuras varía con la distancia a la zona central de formación [9], como se pone de manifiesto al analizar el perfil correspondiente a distintas zonas de medida.

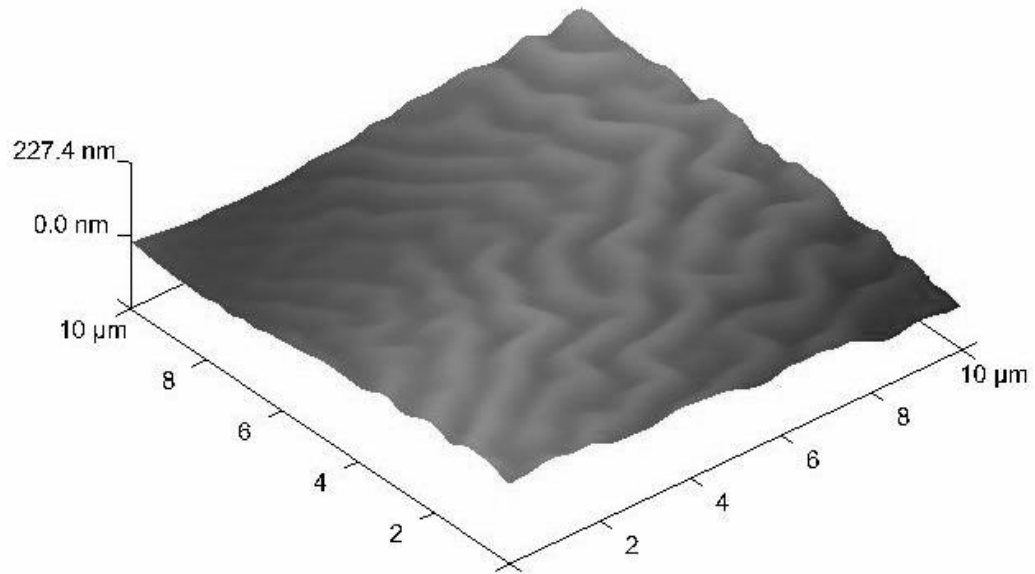


Figura 5.24: Imagen de AFM de un sustrato de silicio monocristalino funcionalizado por TACVD con condiciones: $T_{\text{evap}} = 190^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{act}} = 750^{\circ}\text{C}$, $P_{\text{Ar}} = 1\text{mbar}$, $t = 20\text{ min}$

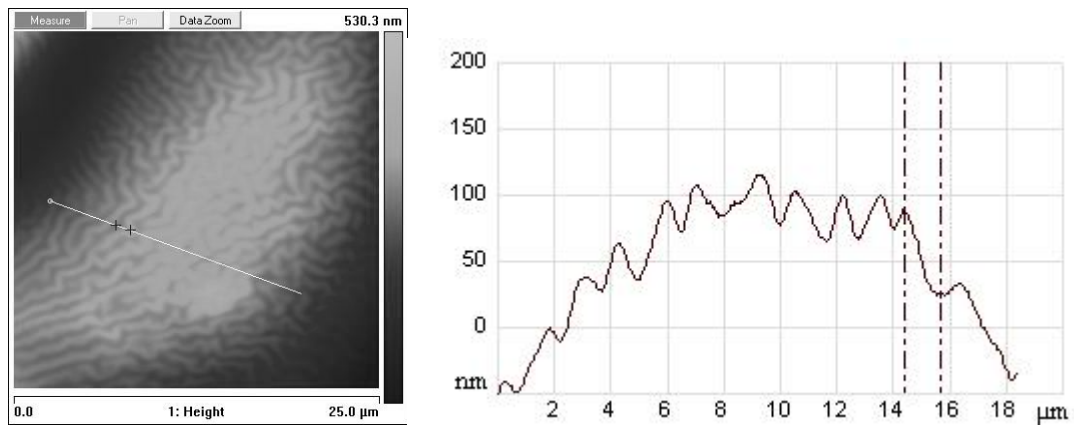


Figura 5.25: Imagen de AFM y perfil correspondientes a un núcleo de formación de laberintos sobre silicio monocristalino.

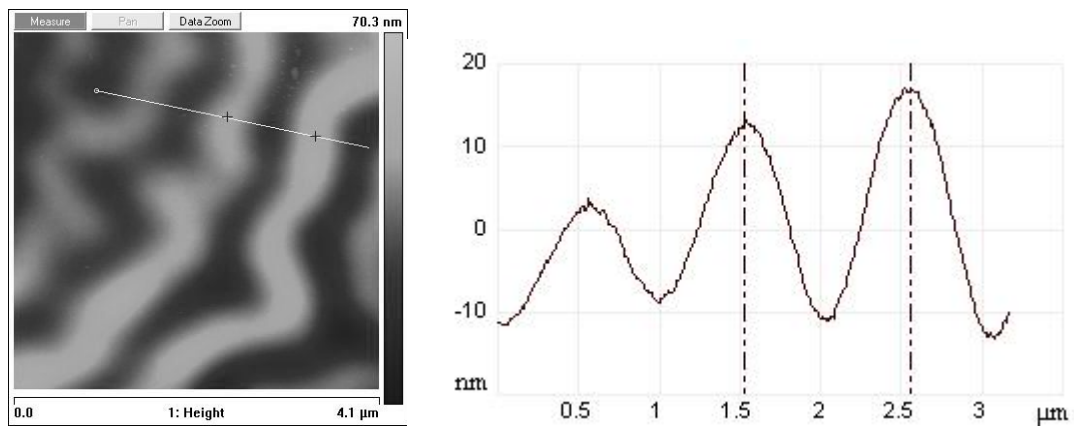


Figura 5.26: Imagen de AFM y perfil correspondiente a zonas alejadas de los núcleos de formación de laberintos sobre silicio monocristalino.

La figura 5.25 muestra la imagen de AFM y el perfil correspondientes a un núcleo de crecimiento. En el perfil anterior, se observa un aumento global de espesor de unos 130 nm, correspondiente al núcleo de formación, y una oscilación, correspondiente a las estructuras tipo laberinto. La altura asociada a estas estructuras varía entre 20 y 50 nm, con una distancia máximo-mínimo que varía entre 0.4 y 0.8 μm . Sin embargo, en zonas alejadas de los núcleos de crecimiento, en las que la morfología que presentan estas estructuras es más próxima a zig-zag, el perfil obtenido es el que se muestra en la figura 5.26. En este caso, la altura del plano medio es constante, la altura de las distintas estructuras oscila entre 20 y 30 nm, es decir, es algo menor que en el caso anterior, y la distancia máximo-mínimo varía entre 0.4 y 0.6 μm .

Uno de los casos en los que la formación de estrías y laberintos aparece modelizada en la bibliografía es como resultado del crecimiento de capas duras sobre sustratos blandos, en condiciones en las que el flujo incidente sobre la superficie es anisótropo [16]. Aunque nuestro sistema de estudio corresponde al caso opuesto, capas blandas (material orgánico) sobre capas duras (silicio monocristalino), es interesante observar que los parámetros de deposición que dan lugar a la formación de estas estructuras, $P_{\text{Ar}} \geq 4 \text{ mbar}$ o de $T_{\text{evap}} \geq 190 \text{ }^{\circ}\text{C}$, equivalen a aumentar el flujo de APTS incidente sobre la muestra. Este aumento del flujo parece estar relacionado con un cambio en el régimen molecular y podría estar generando la llegada de un flujo anisótropo a la cámara de reacción. Esta relación entre las condiciones modelizadas y las condiciones experimentales de formación de estrías y laberintos ha llevado a realizar un análisis de microdureza de las películas funcionales depositadas en las condiciones que dan lugar a la formación de estas estructuras.

5.3.2. Análisis de microdureza.

El interés de las películas biofuncionales en diversas aplicaciones biológicas, entre las que se encuentra el desarrollo de prótesis, así como la formación de las estructuras tipo laberinto y estrías bajo determinadas condiciones de funcionalización (apartado 5.3.1.3), hace que el estudio de las propiedades de microdureza de las capas biofuncionales crecidas en distintas condiciones sea de gran interés. De acuerdo con todo lo anterior, las muestras que se han analizado son las siguientes: silicio

monocristalino (*Si*), puesto que es el sustrato sobre el que se han crecido las películas y sirve de control con el que comparar las propiedades mecánicas de éstas; sustrato de silicio funcionalizado en condiciones de referencia (*SiCR*), por ser las condiciones óptimas de funcionalización para silicio monocristalino; sustrato de silicio funcionalizado con condiciones $T_{\text{evap}} = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{act}} = 750\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P_{\text{Ar}} = 4\text{ mbar}$ y $t_{\text{dep}} = 20\text{ min}$ (*Si4*), correspondientes al inicio de la formación de estrías y laberintos (figura 5.23) y sustrato de silicio monocristalino funcionalizado con condiciones: $T_{\text{evap}} = 190\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{act}} = 750\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P_{\text{Ar}} = 1\text{ mbar}$ y $t_{\text{dep}} = 20\text{ min}$ (*Si190*), en las cuales las estrías y laberintos están completamente formados (figura 5.22).

Para estudiar las propiedades de microdureza de las capas biofuncionales, se ha empleado un ultra-microdurómetro Shimadzu DUH-200, con una punta indentadora de diamante tipo Berkovich. El análisis de las propiedades se ha realizado a partir de ensayos de carga-descarga, aplicando una fuerza tal que la penetración máxima del indentador no supere el 20% del espesor total. Para cumplir este requisito, la carga máxima aplicada fue de 5 mN. El análisis de los parámetros obtenidos de las curvas de carga y descarga tanto directamente como empleando el modelo del paraboloide de revolución se ha realizado basándose en una serie estudios previos realizados con el microdurómetro empleado [17].

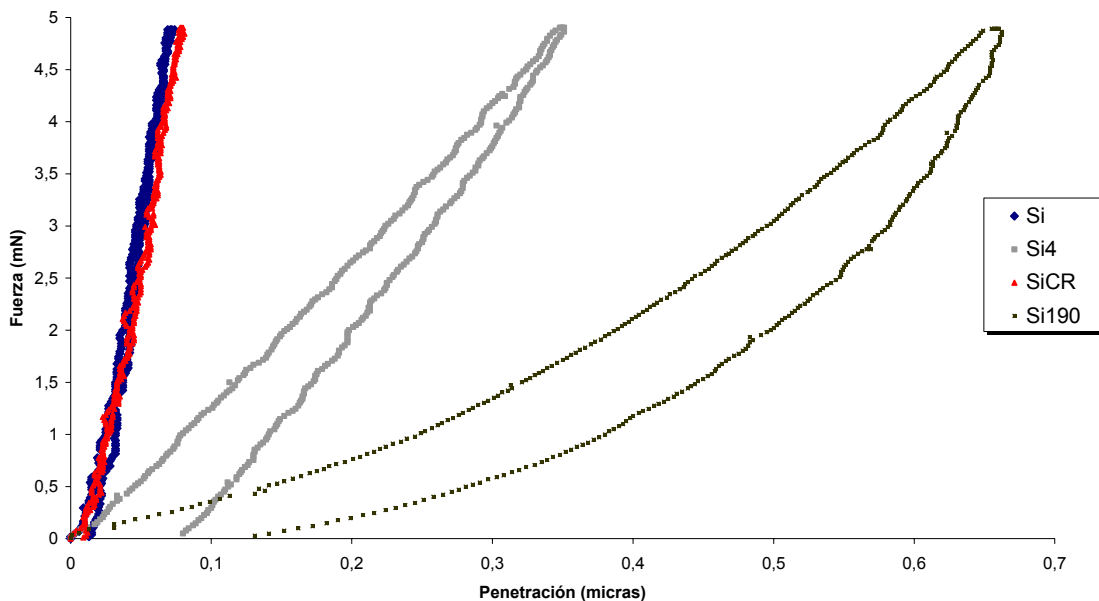


Figura 5.27: Curvas de carga-descarga para las muestras Si, SiCR, Si4 y Si190, descritas en el texto.

Las curvas de carga y descarga obtenidas para cada una de las muestras analizadas, se representan en la figura 5.27. De acuerdo con estas curvas, se observa que las muestras depositadas en condiciones de referencia presentan un comportamiento muy similar al del sustrato de silicio monocristalino, mientras que las muestras asociadas a la formación de estrías y laberintos, P4 y T190, son mucho menos duras y presentan deformaciones de carácter plástico. En la tabla 5.1, se muestran los valores de algunos de los parámetros que pueden obtenerse directamente de las curvas de carga-descarga [14]:

Muestra	h_{\max} (nm)	h_f (nm)	Recuperación (%)	Energía carga (pJ)	Energía descarga (pJ)	ΔE (pJ)
Si	79	13	83	137	129	8
CR	87	9	90	164	161	3
P4	360	80	78	822	199	623
T190	670	131	80	1230	780	450

Tabla 5.1: Parámetros obtenidos directamente a partir de las curvas de carga-descarga de la figura 5.26.

Estos parámetros muestran un comportamiento muy similar entre las películas obtenidas al funcionalizar silicio monocristalino en condiciones de referencia y los sustratos de silicio monocristalino. Así, la penetración máxima del indentador no supera los 90 nm en los casos anteriores, mientras que es de 360 nm para la muestra P4 y llega hasta 670 nm en el caso de la muestra T190. Por otro lado, la energía de la carga, asociada a las deformaciones plástica y elástica, aumenta para las condiciones de deposición correspondientes a la formación de estrías y laberintos. En concreto es 1.2 veces mayor en las películas funcionalizadas en condiciones de referencia, 6 veces mayor en el caso de P4 y llega a 9 veces en el caso de la muestra T190, respecto a los sustratos de silicio monocristalino. La energía de deformación plástica, calculada a partir de la diferencia entre la energía asociada al proceso de carga y la asociada a la descarga, es mucho mayor en las muestras en las que se observó la formación de laberintos. Por último, es interesante destacar que incluso en las muestras que sufren una mayor deformación plástica, la recuperación en la deformación es muy elevada.

Asumiendo el modelo de paraboloide de revolución para la huella producida por el indentador [14, 18], se pueden calcular otros parámetros como el modulo de Young o la microdureza. Los parámetros calculados de esta forma se muestran en la tabla 5.2. En este caso, la división en dos grupos de acuerdo a los valores resultantes es aún más clara.

Muestra	Area (μm^2)	S (mN/ μm)	Microdureza (GPa)	Young (GPa)
Si	0,58	80,8	8,5	108
CR	0,60	92,7	8,2	93
P4	1,78	21,7	0,6	7
T190	7,17	22,5	0,5	8

Tabla 5.2: Parámetros calculados a partir de las curvas de carga-descarga de las muestras analizadas, asumiendo el paraboloide de revolución.

Por lo tanto, las películas obtenidas al funcionalizar sustratos de silicio en condiciones de referencia tienen unas propiedades de microdureza prácticamente iguales a las de los sustratos de silicio, en el rango estudiado. La formación de estructuras tipo laberintos y estrías, modifican significativamente estas propiedades, dando lugar a películas con un comportamiento más plástico y con un módulo de elasticidad del orden de 14 veces menor que el del sustrato de silicio monocristalino.

5.3.3. Análisis de la composición química.

Una vez conocida la morfología de las películas biofuncionales obtenidas en relación a los parámetros de funcionalización, se ha realizado el análisis de la composición química de las mismas. Este análisis de la composición química se ha realizado en tres etapas. En primer lugar, se han analizado las especies químicas presentes en las películas, así como su abundancia relativa en volumen mediante RBS y ERDA. Mediante FTIR se han identificado los enlaces que forman los elementos anteriores y finalmente, por XPS se ha analizado la composición superficial, que es precisamente la parte más relevante de las películas ya que es la que va a interactuar con los sistemas biológicos.

5.3.3.1. RBS y ERDA

Como punto de partida de los análisis de composición química, se han realizado experimentos de RBS y ERDA. Como se explicó en el apartado 2.4.4, empleando una geometría adecuada se pueden realizar los dos tipos de experimentos simultáneamente, de forma que se puedan detectar en las películas biofuncionales todos los elementos que componen la molécula de APTS: Si, C, O, N y H.

Las capas que se analizaron fueron las obtenidas tras funcionalizar sustratos de silicio monocristalino en condiciones de referencia durante 15 minutos. En la figura

5.28 se muestra el espectro de RBS obtenido para estas muestras, en el que se observan las señales correspondientes a Si, O, y C, que aparecen en mayor porcentaje, y a N presente en menor medida.

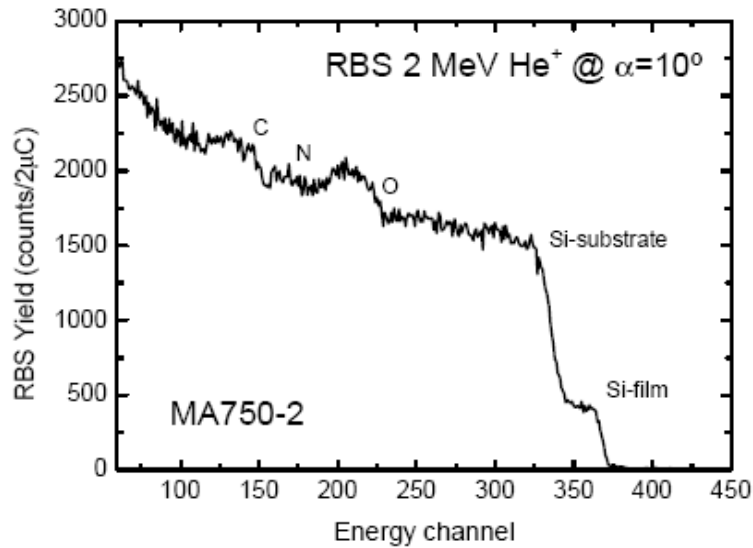


Figura 5.28: Espectro RBS de un sustrato de silicio monocristalino funcionalizado por TACVD en condiciones de referencia durante 15 min.

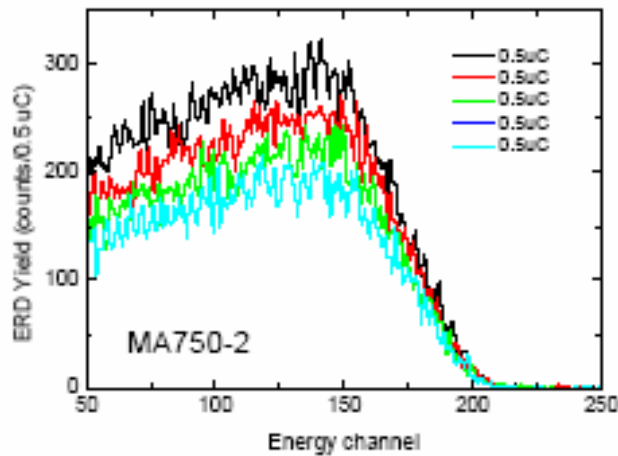


Figura 5.29: Evolución con la dosis de carga de los espectros de ERDA de un sustrato de silicio monocristalino funcionalizado por TACVD en condiciones de referencia durante 15 min.

Los espectros de ERDA confirman la presencia de H en las películas obtenidas (figura 5.29). Como se observa en dichos espectros, al aumentar la dosis se produce una disminución de la intensidad, lo que significa que las películas no son estables frente al haz de iones incidentes y van perdiendo H en las sucesivas medidas. Esto hace necesario medir los espectros con dosis muy bajas de carga.

Finalmente, para realizar un ajuste preciso de la concentración, se realizó un análisis no-Rutherford de la película biofuncional anterior, como se explicó en el apartado 2.4.4. De esta forma se obtienen los distintos porcentajes atómicos para cada elemento, incluido el N, que al ser menos abundante es el más complicado de cuantificar. La figura 5.30 muestra la comparación entre el espectro experimental y el obtenido tras realizar la simulación correspondiente.

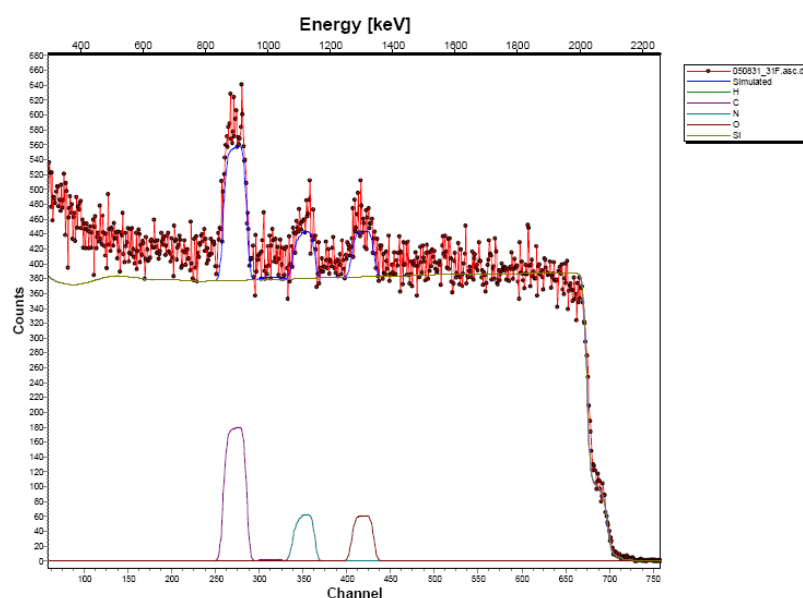


Figura 5.30: Espectro experimental y espectro simulado de un sustrato de silicio monocristalino funcionalizado por TACVD en condiciones de referencia durante 15 min.

Los porcentajes atómicos obtenidos de la simulación anterior son: 29 % de H, 27% de O, 27% de C, 11 % de Si, y 6% de N, con un espesor asociado de 1.1×10^{18} at/cm² (tabla 5.3). Estos valores se corresponden con una estequiometría aproximada de Si_{1.8}O_{4.5}C_{4.5}H_{4.8}N. Comparando con la fórmula correspondiente a la molécula de APTS sin descomponer, SiO₃C₉H₂₃N, y con la de la cadena aminopropil- (Si-C₃H₆-NH₂) unida al Si central de la molécula, SiO₃C₃H₈N, se pueden hacer las siguientes observaciones: mientras que la relación Si/O es 0.4 en las capas biofuncionales, en la molécula de APTS es 0.33, lo que significa que parte de las moléculas de APTS se han descompuesto y se han formado estructuras siloxano (Si-O-Si). Por otra parte, la relación N/Si es 0.5 en las muestras funcionalizadas mientras que en la molécula de APTS y en la cadena aminopropil- es 1, lo que indica que además se ha producido la descomposición de parte de estas cadenas aminopropil-, fenómeno que no se ha observado en los procesos de funcionalización por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno (apartado 4.3). Por último, los valores de la relación C/H son 0.93 en las películas, 0.39 en el APTS y 0.38 en la cadena aminopropil, lo que refleja que las

películas biofuncionales presentan una cantidad de H considerablemente inferior a la esperada. Esto puede explicarse bien porque se haya desprendido gran cantidad de H en el proceso de funcionalización, bien como consecuencia de la inestabilidad de las muestras frente al haz de medida.

C (%)	Si (%)	O (%)	N (%)	H (%)	Espesor (10^{15} at/cm ²)
27	11	27	6	29	1100

Tabla 5.3: Composición atómica porcentual de un sustrato de silicio monocristalino funcionalizado por TACVD en condiciones de referencia.

Es interesante destacar que a partir de la forma del espectro se confirma que el nitrógeno está distribuido a lo largo de todo el volumen. Si mediante otras técnicas, se consigue demostrar que dicho N está en forma de grupos amino, esto supondrá una ventaja importante respecto a la mayoría de técnicas de funcionalización, en las que los grupos amino sólo están en la capa superficial.

Por último, si se comparan los espesores de las películas obtenidos por SEM (4 μ m, figura 5.6) con el espesor equivalente obtenido a partir de los ajustes (1100×10^{15} at/cm²), se puede estimar que la densidad de las películas es 2.3×10^{22} at/cm³.

5.3.3.2. Análisis de la composición por FTIR.

El análisis de la composición de las capas funcionales se realizó por FTIR para películas depositadas sobre silicio monocristalino y silicio poroso en función de los distintos parámetros de funcionalización. Este análisis permite identificar los enlaces que forman los elementos que componen las películas. El estudio se ha realizado inicialmente sobre sustratos funcionalizados en condiciones de referencia, y a continuación se ha analizado la influencia de los parámetros de funcionalización.

Como punto de partida se ha estudiado el espectro correspondiente a un sustrato de **silicio monocristalino** funcionalizado en condiciones de referencia durante 20 minutos. La figura 5.31 muestra el espectro de absorbancia obtenido tomando como referencia la oblea de silicio. Lo primero a destacar es que el espectro de la muestra funcionalizada presenta un ensanchamiento de los picos respecto a los picos presentes en el espectro del APTS (figura 4.9). Este ensanchamiento es característico de la fase condensada, como consecuencia del aumento de las interacciones inter- e intramoleculares [19].

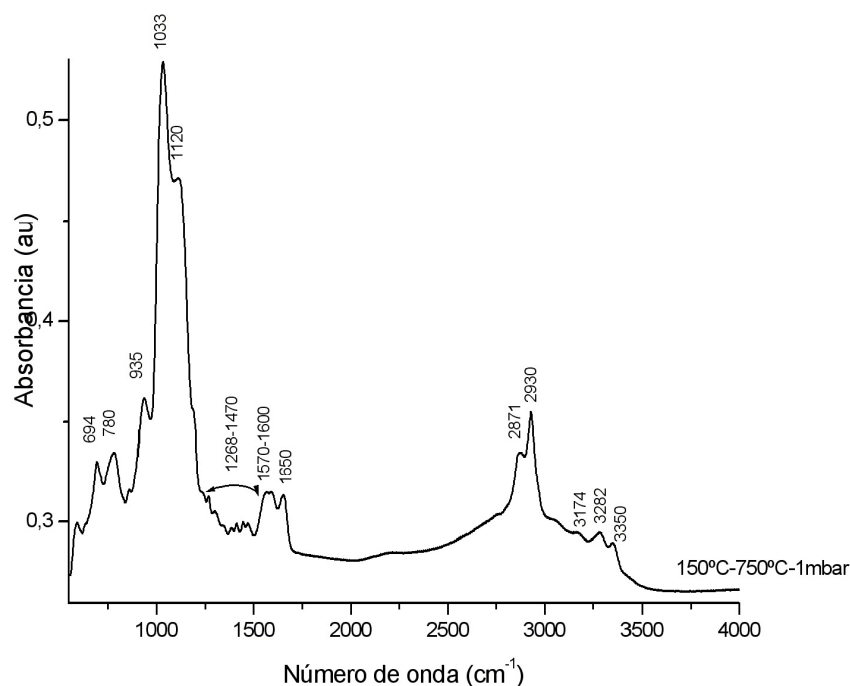


Figura 5.31: Espectro de FTIR de un sustrato de silicio monocristalino funcionalizado por TACVD en condiciones de referencia durante 20 min.

De la misma forma que se observó tras el proceso de inmersión en APTS y tolueno (figura 4.10), las bandas de absorción más importantes del espectro se sitúan en los siguientes rangos: $900\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$, rango en el que se superponen las bandas asociadas a las estructuras Si-O-Si y Si-O-C; $1400\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, rango correspondiente a las estructuras NH_2 y NH_3^+/NH y, por último, $2600\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ que se relaciona con las estructuras CH_x y NH.

Dentro del primer rango, el doblete $1078/1105\text{ cm}^{-1}$ característico de la vibración Si-O-C de las cadenas etoxisilanos, y que aparece en el espectro del APTS, ha sido sustituido por el doblete $1033/1120\text{ cm}^{-1}$, característico de las estructuras del APTS polimerizado y en fase sólida formadas como consecuencia del proceso de funcionalización por TACVD. Además, la banda 956 cm^{-1} asociada también a grupos etoxi aparece desplazado a 930 cm^{-1} [20]. Todo lo anterior indica que un gran porcentaje de las moléculas de APTS se descomponen perdiendo las cadenas etoxi.

El segundo rango, $1400\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, está compuesto por la superposición de las siguientes bandas: 1470 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de los grupos CH_2 de la cadena propil- y 1567 y 1650 cm^{-1} , correspondientes a la vibración δ (*wagg*) de los

grupos amino, en particular a grupos amino asociados y libres, respectivamente [21]. Los grupos amino asociados pueden ser aminas protonadas, es decir, grupos amino que se encuentran formando enlaces por puente de hidrógeno (NH_3^+), como ocurría en las muestras funcionalizadas por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno, o bien aminas secundarias ($=\text{NH}$). Aunque otros autores asignan estas dos bandas a bicarbonato amónico [2], formado como consecuencia de la exposición a la atmósfera, los análisis de XPS que se muestran en el apartado 5.3.3.3 indican que en este caso se corresponde con la primera asignación. Es interesante destacar, que aparece además una tercera contribución asociada a grupos amino, centrada en 1600 cm^{-1} y correspondiente a grupos amino asociados. La diferencia entre 1600 y 1567 cm^{-1} , se relaciona con la intensidad del enlace [22].

Finalmente, las bandas presentes en el rango $2600\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ son 2878 y 2931 cm^{-1} , correspondientes a la vibración ν (*stretch*) simétrica y asimétrica de los CH_2 de la cadena propil, las bandas 3280 y 3350 cm^{-1} correspondientes con la vibración ν simétrica y asimétrica de los grupos amino, y el pico 3174 cm^{-1} asociado a grupos amino formando parte de estructuras en las que aparecen enlaces por puente de hidrógeno de gran intensidad [23]. Es interesante destacar que no se observa ninguna banda correspondiente a las vibraciones CH de las cadenas etoxi, lo que indica una vez más que se han perdido de manera mayoritaria como consecuencia del proceso de descomposición térmica del APTS.

Las diferencias encontradas respecto a los espectros de FTIR de sustratos de silicio funcionalizados por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno (figura 4.10) se relacionan con una mayor complejidad de los espectros y un mayor solapamiento de las bandas de absorción presentes en los de TACVD, así como con la aparición de bandas correspondientes a la formación de nuevas estructuras. Algunos ejemplos concretos de estas diferencias son la aparición de la banda centrada en 1263 cm^{-1} (Si-CH_3), un menor desdoblamiento de los picos 1033 y 1120 cm^{-1} o la presencia de las vibraciones ν_a y ν_s de los grupos amino además del pico 3174 cm^{-1} . Todo esto indica que el APTS sufre una mayor descomposición como consecuencia del proceso de TACVD, dando lugar a interacciones entre los átomos de mayor complejidad.

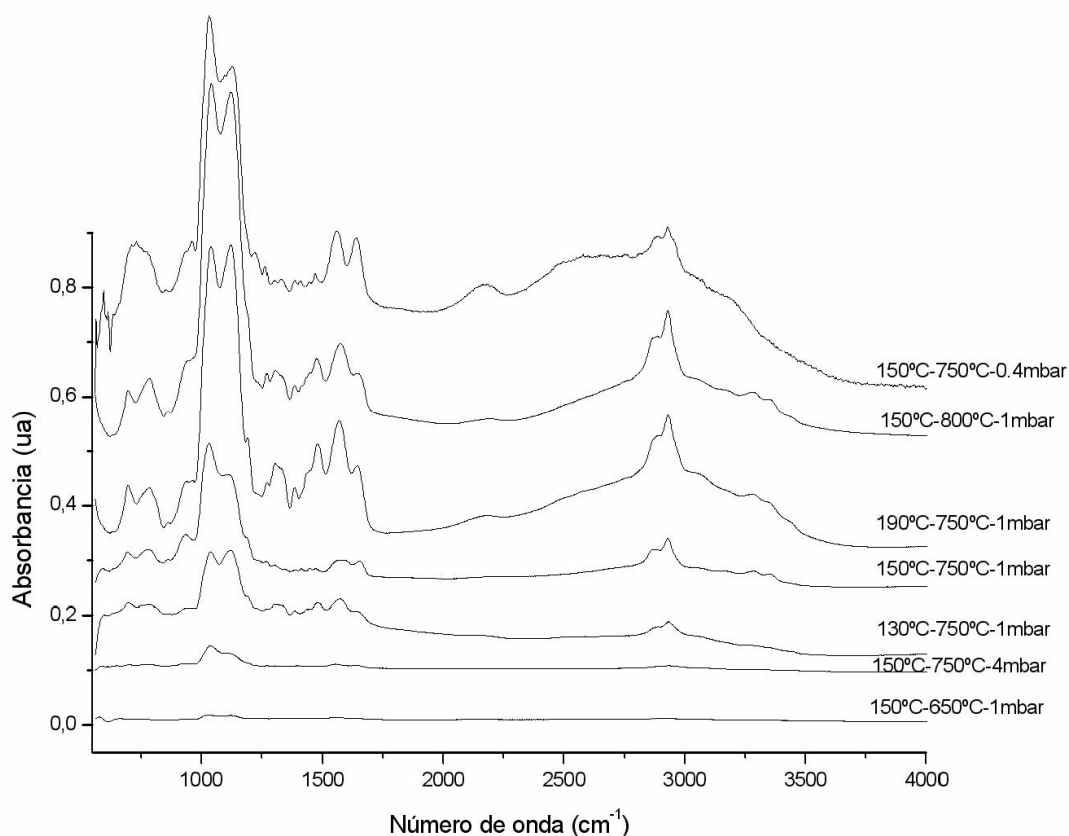


Figura 5.32: Espectros de FTIR de sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD con diferentes condiciones.

Una vez caracterizadas las bandas de absorción presentes en los espectros obtenidos al funcionalizar silicio monocristalino en condiciones de referencia, se ha estudiado la influencia de los parámetros de funcionalización, obteniendo los siguientes espectros (figura 5.32). Las posiciones en las que se encuentran los picos más relevantes, junto con la asignación correspondiente, están recogidos en la tabla 5.4, para las distintas condiciones estudiadas.

A partir de las variaciones en la forma, posición y área bajo la curva de las bandas de absorción de los distintos espectros, se ha realizado el estudio de la influencia de los diferentes parámetros de deposición en las capas resultantes.

Comparando los espectros correspondientes a muestras funcionalizadas con diversas **temperaturas de activación** (T_{act}), se observan diferencias en cuanto a la posición de los picos de absorción, la presencia de determinadas estructuras y la intensidad de las bandas. Respecto a la posición, se observa que al aumentar la temperatura se produce un desplazamiento de los máximos de absorción hacia valores superiores del número de onda: el doblete $1030-1117\text{ cm}^{-1}$, se desplaza hacia $1040-1124$

cm^{-1} y se produce un desdoblamiento claro de ambas contribuciones, lo que se relaciona con un aumento de la longitud de la cadena de polímero de APTS. Las posiciones correspondientes a grupos amino también se desplazan de 1554 y 1636 cm^{-1} a 1571 y 1653 cm^{-1} , respectivamente, al aumentar la T_{act} debido a la variación en la intensidad de las interacciones asociadas a dichos grupos. Mientras que en el espectro correspondiente a la muestra funcionalizada a $T_{\text{act}} = 650^\circ\text{C}$ aparece una banda en 1230 cm^{-1} , correspondiente a Si-CH_2 , para $T_{\text{act}} \geq 750^\circ\text{C}$, aparece en su lugar la banda 1268 cm^{-1} , correspondiente a estructuras Si-CH_3 . Los enlaces Si-CH_2 forman parte de la estructura del APTS, formando la unión entre el átomo de Si central y la cadena aminopropil, sin embargo, las estructuras Si-CH_3 se forman como resultado de la descomposición del precursor. La componente en 3174 cm^{-1} , correspondiente a los grupos amino que forman los enlaces de hidrógeno de mayor intensidad, sólo aparece para $T_{\text{act}} \geq 750^\circ\text{C}$. Por último, el aumento de la temperatura de activación da como resultado películas con bandas de absorción más intensas.

	$T_{\text{evap}} (^\circ\text{C}) - T_{\text{act}} (^\circ\text{C}) - P_{\text{Ar}} (\text{mbar})$							
APTS	130-750-1	150-750-1	190-750-1	150-650-1	150-800-1	150-750-4	150-750-0,4	Asignación
694	697	696	697	703	698	700	694	Si-O-Si
	755		755	765		755	732	
786	790	779	790		784	795	773	ν Si-C
	930	935	940	935	939	946	933	SiOH-NH ₂ /Si-N
956	960		960				962	
	1036	1033	1036	1030	1045	1041	1031	Si-O-Si
1078							1097	Si-OEt
1105								Si-OEt
	1122	1120	1122	1120	1124	1120	1130	Si-O-Si
1166								Si-O-C (etox)
	1191	1191	1191	1195	1193	1195		Si-O-CH ₃
				1230			1222	Si-CH ₂
	1268	1263	1263		1268	1272	1265	Si-CH ₃
1294	1303	1300	1300	1300	1301	1306	1299	C-N
1390	1384	1386	1380	1394	1382	1396	1384	CH (CH ₃ de OEt)
1450	1432	1444	1434				1442	CH ₂ (propil)
	1482	1471	1479		1473		1469	ν CH ₂ (polimer)
				1535				
1550	1575	1559	1567	1562	1570	1554	1558	NH ₃ ⁺ /R-NH
		1599						NH ₃ ⁺ /R-NH
1652	1651	1653	1649	1625	1643	1635	1639	NH ₂
2885	2884	2871	2878	2880	2871	2888	2883	ν_s CH ₂ (propil)
2925	2931	2930	2935	2935	2931	2937	2931	ν_a CH ₂ (propil)
2973						2967	2964	CH (CH ₃ de OEt)
	3068	3061	3062		306	3050		
		3174			3174		3187	NH ₂ -OH (intenso)
	3276	3282	3308		3291	3288		ν_s NH ₂
	3351	3350	3392	3360	3353			ν_a NH ₂
3440	3440							NH ₂

Tabla 5.4: Posiciones de las bandas de absorción FTIR más representativas encontradas en los sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD.

El área bajo la curva asociada a los rangos 930-1200 y 1550-1670 cm^{-1} se muestra en la tabla 5.5. Puesto que el cociente entre el área asociada a las distintas muestras varía de unos rangos a otros y es distinto a su vez del cociente entre espesores, el aumento de la intensidad se puede atribuir no sólo a la variación de espesor sino a la variación en la composición, de acuerdo con la ley de Lambert-Beer (2.2). Por su parte, el porcentaje de área del rango 1550-1670 cm^{-1} asociado a la vibración δ de los grupos amino en forma NH_2 aumenta con la temperatura de activación.

Rango (cm^{-1})	Area (ua)		
	Si650	Si750	Si800
930-1200	$2,1 \pm 0,6$	35 ± 1	106 ± 2
1550-1670	$0,2 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,2$	$15,6 \pm 0,3$

Tabla 5.5: Área bajo la curva asociada a estructuras Si-O-Si/Si-C (930-1200 cm^{-1}) y $\text{NH}_2/\text{R-NH}$ (1550-1670 cm^{-1}) de sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD con distintas T_{act} .

Al variar la **temperatura de evaporación** (T_{evap}), la posición de los picos no sufre variaciones tan relevantes como las observadas en el caso de la temperatura de activación. Es interesante destacar que para $T_{\text{evap}} = 130^\circ\text{C}$, el pico 3440 cm^{-1} correspondiente a la vibración ν de los grupos amino coincide con el encontrado en el APTS. Como en el caso de la temperatura de activación, el aumento de la temperatura de evaporación lleva asociado un incremento en la intensidad de las bandas de absorción, que implica una diferencia tanto de composición como de espesor de unas muestras a otras. Esto se desprende del hecho de que los cocientes de las áreas asociadas a las distintas regiones de absorción (tabla 5.5) sean distintos de los cocientes de espesores. Como se observa en la tabla 5.6, el área de las distintas bandas de absorción aumenta con la temperatura de evaporación. En este caso, es interesante destacar que mientras que el área total de la banda asociada a la vibración δ (1550-1670 cm^{-1}) de los grupos amino aumenta con la T_{evap} , el área del pico asociado a aminos primarios (NH_2) alcanza su máximo valor para la muestra correspondiente a $T_{\text{evap}} = 150^\circ\text{C}$. Esta diferencia se explica debido a que el aumento de la temperatura de evaporación da como resultado una mayor presencia de grupos amino en forma asociada ($=\text{NH}$), mientras que en forma de NH_2 el valor máximo se obtiene para $T_{\text{evap}} = 150^\circ\text{C}$, correspondiente a las condiciones de referencia.

Rango (cm ⁻¹)	Area (ua)		
	Si130	Si150	Si190
930-1200	19,1 ± 0,3	35 ± 1	89 ± 2
1550-1670	3,3 ± 0,3	4,4 ± 0,2	19,8 ± 0,2

Tabla 5.6: Área bajo la curva asociada a estructuras Si-O-Si/Si-C (930-1200 cm⁻¹) y NH₂/=NH (1550-1670 cm⁻¹) de sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD con distintas T_{evap}.

Como consecuencia del aumento de la **presión de argón** (P_{Ar}) se observa un desplazamiento de los picos de absorción hacia valores mayores del número de onda. Así, la muestra funcionalizada con P_{Ar} = 0.4 mbar presenta las bandas de absorción características de los grupos etoxi (962, 1097, 2964 cm⁻¹) superpuestas con las asociadas a la formación de polímeros (1031, 1130, 1469 cm⁻¹), lo que significa que la descomposición del APTS es menor que en las muestras correspondientes a P_{Ar} ≥ 1 mbar. Estas últimas bandas son las encontradas en el espectro de la muestra funcionalizada en condiciones de referencia, es decir, correspondientes a una mayor descomposición del APTS, y en la que no aparecen las bandas correspondientes a las cadenas etoxi. La intensidad de las bandas disminuye al aumentar la presión, siendo prácticamente despreciable en el caso de P_{Ar} = 4 mbar (figura 5.31). La variación del área bajo la curva se recoge en la tabla 5.7.

Rango (cm ⁻¹)	Area (ua)		
	Si0,4	Si1	Si4
930-1200	84 ± 4	35 ± 1	4,96 ± 0,07
1550-1670	15,4 ± 0,2	4,4 ± 0,2	0,78 ± 0,04

Tabla 5.7: Área bajo la curva asociada a estructuras Si-O-Si/Si-C (930-1200 cm⁻¹) y NH₂/R-NH (1550-1670 cm⁻¹) de sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD con distintas P_{Ar}.

Como se desprende de los valores anteriores, al aumentar la presión se produce una disminución de la intensidad de las bandas de absorción presentes en los espectros y, en particular en la asociada a grupos amino.

Por tanto, el estudio de la influencia de los parámetros de funcionalización en la composición química de las películas crecidas sobre silicio monocristalino, muestra los siguientes resultados: existe una temperatura de activación a partir de la cual aparecen bandas de absorción correspondientes a nuevos tipos de enlaces respecto a la molécula de APTS y a los encontrados tras el proceso de funcionalización por inmersión en APTS y tolueno (figura 4.10) y que no aparecen por debajo de dicha temperatura. La intensidad de las bandas de absorción del espectro FTIR es casi despreciable, por debajo

de la temperatura mínima de activación, demostrándose que el proceso sucede mediante la activación térmica del APTS.

El aumento de la temperatura de evaporación da lugar al aumento de la intensidad de las bandas de absorción así como a la aparición de las bandas propias del proceso de TACVD a partir de un determinado valor de temperatura. En particular, para $T_{\text{evap}} = 130\text{ }^{\circ}\text{C}$ la mayor parte de las bandas presentes en el espectro son las asociadas al APTS líquido (figura 4.9) mientras que para temperaturas superiores son las asociadas a la descomposición del APTS. Por último, la presión de argón tiene un efecto parecido al de la T_{evap} , en el sentido de que para presiones por debajo de un determinado valor ($P \leq 0.4\text{ mbar}$) las bandas de absorción son esencialmente las del APTS líquido y por encima las asociadas a su descomposición. La única diferencia es que la intensidad correspondiente aumenta con la presión hasta $P = 1\text{ mbar}$ mientras que por encima de dicho valor la intensidad disminuye.

A continuación, se ha repetido el análisis empleando **sustratos de silicio nanoestructurado (SP_n)**. El espectro correspondiente a un sustrato funcionalizado en condiciones de referencia durante 20 minutos se muestra en la figura 5.33. Las bandas de absorción más importantes encontradas al emplear SP_n como sustrato muestran diferencias respecto a las encontradas al emplear silicio monocristalino. Como punto de partida cabe destacar la existencia de bandas de absorción propias del SP_n , ya identificadas en el capítulo 3 (figura 3.4), como son la banda correspondiente a estructuras SiH_x , centrada en 2100 cm^{-1} , y las bandas correspondientes a OSiH_x y a la formación de silanoles, centradas en 2265 cm^{-1} y en 890 cm^{-1} , respectivamente, que indican una cierta oxidación del sustrato de SP_n durante el proceso. Sin embargo, a diferencia de lo que se observó tras funcionalizar por inmersión en APTS y tolueno (figura 4.11), las bandas que aparecen como consecuencia del proceso de funcionalización por TACVD tienen una intensidad suficiente para poder resolverlas e identificarlas.

Las diferencias más destacables respecto a los sustratos de silicio monocristalino funcionalizados corresponden a la banda comprendida en el rango $920\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$. En este rango se superponen, además de las bandas asociadas a la oxidación del SP_n (1070 y 1118 cm^{-1} , apartado 3.2.2), los picos de absorción 956 , 1160 cm^{-1} y el doblete $1055\text{-}1090\text{ cm}^{-1}$, asociados a las estructuras Si-O-C de las cadenas etoxi y las bandas 940 , 1055 y 1112 cm^{-1} asociadas a Si-O-Si de las estructuras siloxano, como consecuencia de

la polimerización del APTS. Además, los picos 1055 y 1122 cm^{-1} , presentan una mayor superposición que en el caso del silicio monocristalino. La presencia de todas estas bandas por un lado dificulta el análisis de esta región, pero por otro permite proponer que el APTS sufre una menor descomposición, permaneciendo intacto un número elevado de cadenas etoxi, y que se forman oligómeros compuestos por un número menor de moléculas de APTS sobre silicio nanoestructurado que sobre silicio monocristalino.

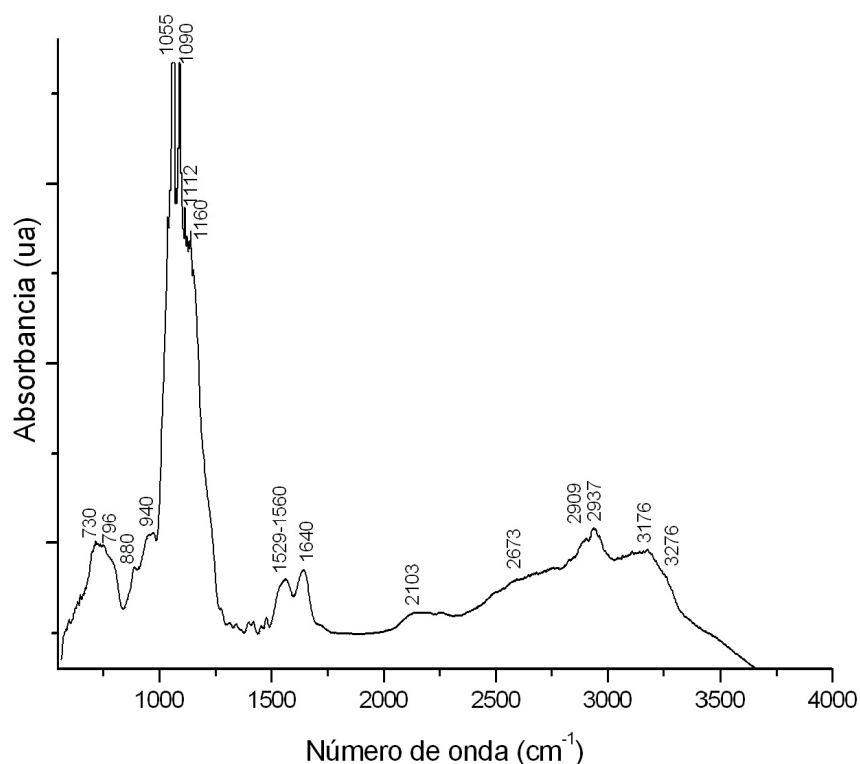


Figura 5.33: Espectro de FTIR de un sustrato de silicio nanoestructurado funcionalizado por TACVD en condiciones de referencia durante 20 min.

La región $1400\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ está compuesta por tres bandas de absorción: 1536 , 1560 y 1642 cm^{-1} . Las dos primeras corresponden a aminas asociadas, protonadas o aminas secundarias, y la tercera a grupos NH_2 . Es interesante destacar que la intensidad del pico asociado a grupos NH_2 es ligeramente superior al correspondiente a aminas asociadas, al contrario de lo que ocurriría sobre los sustratos de silicio monocristalino. Por tanto, aunque el APTS se descompone en menor medida, da lugar a la deposición de más nitrógeno en forma de grupos amino (NH_2).

La tercera región presenta las bandas correspondientes a las vibraciones ν (*stretch*), simétrica y asimétrica, de las estructuras C-H de la cadena propil. En esta banda también aparece un pequeño pico a 2962 cm^{-1} , asociado a los C-H presentes en los grupos etoxi, lo que confirma una vez más que el APTS se hidroliza en menor proporción que en el caso de los sustratos de silicio monocristalino. Por último, las vibraciones ν de grupos amino presentan tres máximos: 3176 cm^{-1} , correspondiente a grupos NH_2 formando enlaces por puentes de hidrógeno de elevada intensidad, y 3108 y 3450 cm^{-1} (vibración asimétrica y simétrica). Todo este rango se encuentra modulado por una banda de gran anchura, correspondiente a estructuras asociadas a grupos OH, que no se observaba en el caso del silicio monocristalino. Esta banda aparecía en los sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por inmersión (figura 4.10) por lo que se puede relacionar con los grupos silanoles del APTS hidrolizado y sin condensar.

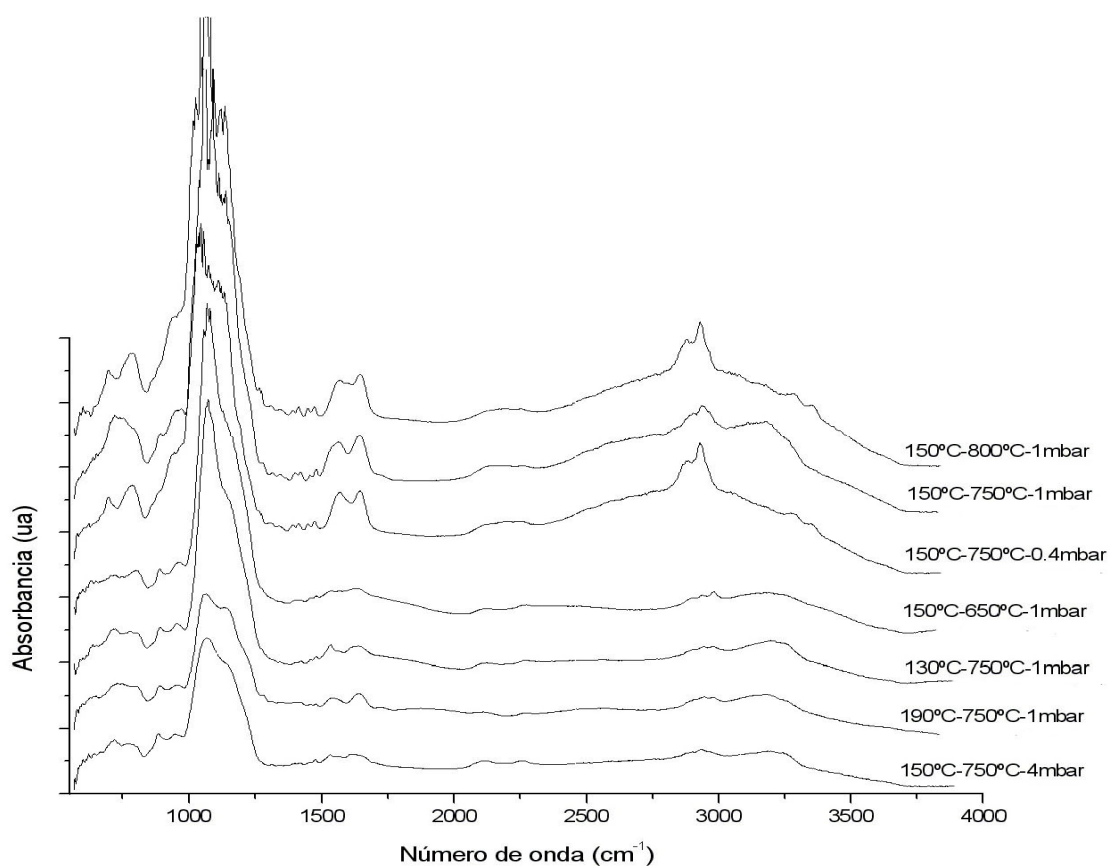


Figura 5.34: Espectros de FTIR de sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD con distintos parámetros.

Por lo tanto, las diferencias más significativas entre los resultados obtenidos sobre silicio nanoestructurado y los obtenidos sobre silicio monocristalino son la

presencia de bandas de absorción que indican que las moléculas de APTS han sufrido una descomposición menor, la formación de oligómeros compuestos por un número menor de moléculas de APTS y una contribución mayor de grupos NH_2 libres frente a grupos amino asociados.

La influencia de la variación de los parámetros de funcionalización se ha estudiado a partir de los espectros mostrados en la figura 5.34, encontrando diferencias significativas al variar los distintos parámetros y respecto a los sustratos de silicio monocristalino. En la tabla 5.8 se muestran las posiciones de las bandas de absorción más importantes.

APTS	$T_{\text{evap}} (^{\circ}\text{C}) - T_{\text{act}} (^{\circ}\text{C}) - P_{\text{Ar}} (\text{mbar})$							Asignación
	T650	T750	T800	T130	T190	P0.4	P4	
				638				Si-Si
694			696			694		Si-O-Si
		719		717	730		714	
		752					769	
786	798	792	784	779	796	781		ν Si-C
				812				
	890	892		890	889		886	SiOH
		940	933			943		SiOH-- NH_2 /Si-N
956	960	970	964	956	956		950	
	1056	1055	1054			1045		Si-O-Si
	1070			1072	1068		1070	SiO_x
1078	1079	1090						Si-OEt
1105		1112				1108		Si-OEt
			1135		1141	1135	1147	Si-O-Si
1166	1160	1155		1157				Si-O-C(etox)
			1197			1193		Si-O- CH_3
		1222			1210			Si- CH_2
					1278			Si- CH_3
1294								C-N
					1342			
1390		1398	1411		1400	1390		CH (CH_3 de OEt)
		1419	1446	1421	1455	1410		CH_2 (propil)
1450						1446		
		1479	1471	1477	1475	1473	1473	ν CH_2 (polimer)
	1531	1536		1531	1535		1533	$\text{NH}_3^+/\text{R-NH}$
1550		1560	1567		1541	1567	1562	$\text{NH}_3^+/\text{R-NH}$
			1598					NH_2 free
							1614	NH_2
	1631			1635	1639	1644	1644	NH_2
1652		1642	1644	1646				
	2114	2109	2140	2121	2117	2100	2114	SiH_x
	2265	2256	2252	2264	2264	2252	2256	
2885		2873	2881			2877	2898	ν_s CH_2 (propil)
	2906	2902		2906				
2925			2929			2929	2933	ν_a CH_2 (propil)
	2940	2937		2940	2948			
		2962					2967	
2973	2983			2983	2980			CH (CH_3 de OEt)
		3108	3054		3098	3060		
	3176	3176	3171	3195	3183		3190	$\text{NH}_2\cdots\text{OH}$ (intenso)
				3241				ν_s NH_2
			3282			3274		
3440			3351			3349		ν_a NH_2
		3497						NH_2

Tabla 5.8: Posiciones de las bandas de los picos de absorción más representativas encontradas en los sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD.

El aumento de la **temperatura de activación** en el rango 650-750°C se traduce en un aumento de la intensidad de las bandas de absorción, de la misma forma que ocurría sobre el silicio monocristalino. Sin embargo, los espectros correspondientes a 750 y a 800°C presentan bandas de absorción con intensidades muy similares, y la diferencia entre ambos está originada esencialmente por la posición de los picos. Las películas resultantes de la funcionalización de sustratos de SP_n empleando temperaturas de activación de 650 y 750°C muestran la presencia de estructuras Si-OH, así como la superposición de las bandas de absorción correspondientes a las estructuras Si-O-R del APTS sin hidrolizar (R = Et) y de estructuras siloxano (R = Si). Sin embargo, para T_{act} = 800°C, estas dos bandas desaparecen lo que se puede relacionar con una mayor descomposición del APTS. Otra diferencia observada es que el aumento de la temperatura de activación produce un ensanchamiento en las bandas de absorción correspondientes al rango 900-1200 cm⁻¹, como consecuencia de las vibraciones Si-O de las moléculas de APTS condensadas. Las bandas de absorción correspondientes a grupos CH en el rango 1300-1480 cm⁻¹ sólo aparecen en los espectros correspondientes a T_{act} ≥ 750°C. En cuanto a las vibraciones δ de los grupos amino (1530-1644 cm⁻¹), en el caso de 650°C se encuentran dos modos, mientras que a temperaturas superiores se encuentran tres. Es interesante destacar que los modos obtenidos para T_{act} = 800°C en SP_n se corresponden con los obtenidos para silicio a T_{act} = 750°C. Finalmente, en el rango correspondiente a la vibración ν, la única componente común es la asociada a grupos amino que forman enlaces de hidrógeno y además se observa un mayor número de contribuciones al elevar la T_{act}, lo que pone de manifiesto que el aumento de temperatura de activación da como resultado estructuras con mayor complejidad en las interacciones inter- e intramoleculares. De nuevo en este rango, las posiciones obtenidas para 800°C, coinciden con las obtenidas para 750°C.

El área bajo la curva asociada a las bandas de absorción principales se recoge en la tabla 5.9. En este caso, el ajuste de las áreas lleva asociado un error mayor que en el caso del silicio monocristalino, especialmente en el rango 930-1220 cm⁻¹, debido al elevado número de contribuciones que se superponen y que dificultan la deconvolución de las bandas. Mientras que la muestra correspondiente a T_{act} = 650°C presenta un área bajo la curva comparable al resto de temperaturas en la región 930-1220 cm⁻¹, el área correspondiente a la región de los grupos amino es significativamente menor. Esto puede explicarse porque en la región 930-1200 cm⁻¹ se superponen además los modos de vibración asociados a la oxidación que sufre el sustrato como consecuencia del

proceso de funcionalización. A diferencia de lo que ocurría en las películas depositadas sobre silicio monocristalino, el área asociada a la vibración δ de los grupos amino es prácticamente igual para 750 y 800°C.

Rango (cm^{-1})	Area (ua)		
	SP650	SP750	SP800
930-1220	453 \pm 32	472 \pm 59	452 \pm 56
1550-1670	9.8 \pm 0.6	43 \pm 2	40 \pm 1

Tabla 5.9: Área bajo la curva asociada a estructuras Si-O-Si/Si-C ($930\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) y $\text{NH}_2/\text{R-NH}$ ($1550\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$) de sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD con distintas T_{act} .

Los espectros obtenidos al variar **la temperatura de evaporación** muestran que la máxima intensidad de las bandas se obtiene para un valor de temperatura de 150°C. A diferencia de lo observado en el caso de los sustratos de silicio monocristalino funcionalizados, el aumento de temperatura por encima de este valor produce una disminución en la intensidad del espectro. En el rango $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, la posición de los máximos del espectro de las muestras obtenidas con $T_{\text{evap}} = 130^\circ\text{C}$ se corresponde con la presencia de cadenas etoxi, para $T_{\text{evap}} = 150^\circ\text{C}$ se observa la superposición de contribuciones asociadas a cadenas etoxi y a estructuras siloxano, mientras que para $T_{\text{evap}} = 190^\circ\text{C}$, básicamente se encuentran las bandas asociadas a las estructuras siloxano. Por lo tanto, el aumento de la temperatura de evaporación produce un aumento en el porcentaje de moléculas de APTS que se han descompuesto perdiendo las cadenas etoxi y favorece la formación de oligómeros mediante estructuras siloxano. En el rango $1530\text{-}1646\text{ cm}^{-1}$, la muestra correspondiente a $T_{\text{evap}} = 130^\circ\text{C}$ presenta tres bandas, una de ellas asociada a aminas secundarias y las otras dos a aminas primarias, mientras que para $T_{\text{evap}} \geq 150^\circ\text{C}$ ocurre lo contrario, es decir, dos de las contribuciones corresponden a aminas secundarias y una a aminas primarias.

Rango (cm^{-1})	Area (ua)		
	SP130	SP150	SP190
930-1220	317 \pm 10	472 \pm 59	154 \pm 9
1550-1670	17 \pm 1	43 \pm 2	15 \pm 2

Tabla 5.10: Área bajo la curva asociada a estructuras Si-O-Si/Si-C ($930\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) y $\text{NH}_2/\text{R-NH}$ ($1550\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$) de sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD con distinta T_{evap} .

El área bajo la curva de las dos regiones principales de absorción, en función de la temperatura de evaporación, se recoge en la tabla 5.10. La muestra correspondiente a

$T_{\text{evap}} = 150^{\circ}\text{C}$ es la que tiene mayor área en los dos rangos analizados, seguida de $T_{\text{evap}} = 130^{\circ}\text{C}$ y, por último, de $T_{\text{evap}} = 190^{\circ}\text{C}$, es decir, que a diferencia de lo observado en silicio, sobre SP_n el área no aumenta con la temperatura de evaporación.

Por último, se ha estudiado la influencia de la variación de la **presión de argón**. Los sustratos funcionalizados con $P_{\text{Ar}} = 4$ mbar presentan bandas de absorción con una intensidad muy baja, al igual que ocurría sobre silicio monocristalino. Sin embargo, la posición de los máximos de absorción se corresponde con la presencia de cadenas etoxi, mientras que para $P_{\text{Ar}} \leq 1$ mbar, los picos presentes están asociados a un mayor grado de descomposición del precursor. Este comportamiento es justo el opuesto al observado en el caso de los sustratos de silicio monocristalino, en los que la muestra obtenida para $P_{\text{Ar}} = 0.4$ mbar era la que mostraba un menor grado de descomposición.

Las áreas correspondientes a los rangos $930\text{-}1220\text{ cm}^{-1}$ y $1530\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$, se recogen en la tabla 5.11. El área bajo la curva en los dos rangos estudiados se ordena de mayor a menor de acuerdo a los siguientes valores de presión: 1, 0.4 y 4 mbar.

Rango (cm^{-1})	Area (ua)		
	SP0.4	SP1	SP4
930-1220	379 ± 30	472 ± 59	192 ± 6
1550-1670	39.7 ± 0.7	43 ± 2	9 ± 1

Tabla 5.11: Área bajo la curva asociada a estructuras Si-O-Si/Si-C ($930\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) y $\text{NH}_2/\text{R-NH}$ ($1550\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$) de sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD con distinta P_{Ar} .

Por tanto, las variaciones encontradas en los espectros de los sustratos de silicio nanoestructurado, como consecuencia de la variación de los parámetros de funcionalización, son análogas a las encontradas sobre silicio monocristalino, salvo algunas excepciones. Por ejemplo, sobre SP_n la temperatura mínima de activación que da lugar a la descomposición del APTS es 800°C , en lugar de 750°C , aunque para esta última ya estén presentes la mayoría de las bandas asociadas a la descomposición del precursor. El aumento de la temperatura de evaporación por encima de 150°C da lugar a una disminución en la intensidad de las bandas y el espectro correspondiente a un sustrato de SP_n funcionalizado con $P_{\text{Ar}} = 4$ mbar corresponde con el de un sustrato de silicio monocristalino funcionalizado con $P_{\text{Ar}} = 0.4$ mbar.

El espectro de FTIR obtenido para **sustratos de silicio macroporoso** funcionalizados en condiciones de referencia se muestra en la figura 5.35. Los picos

están claramente diferenciados y muestran poca superposición, lo que se relaciona con una menor complejidad de las interacciones inter- e intra- moleculares. Las bandas de absorción encontradas son las siguientes: 622 cm^{-1} (SiH), 740 cm^{-1} (CH_2), 885 cm^{-1} (SiOH), 944 cm^{-1} (SiOH---NH₂), 1052 y 1133 cm^{-1} (Si-O-Si), 1228 cm^{-1} (Si-CH₂), 1471 cm^{-1} (CH_2 en APTS polimerizado), 1619 cm^{-1} (δNH_2), 2937 cm^{-1} (CH_2 de la cadena propil), 2977 cm^{-1} (CH de los CH_3 de los grupos etoxi), 3131 y 3224 cm^{-1} (v asimétrico y simétrico de NH₂, respectivamente) y 3189 cm^{-1} (NH₂ formando enlaces de hidrógeno).

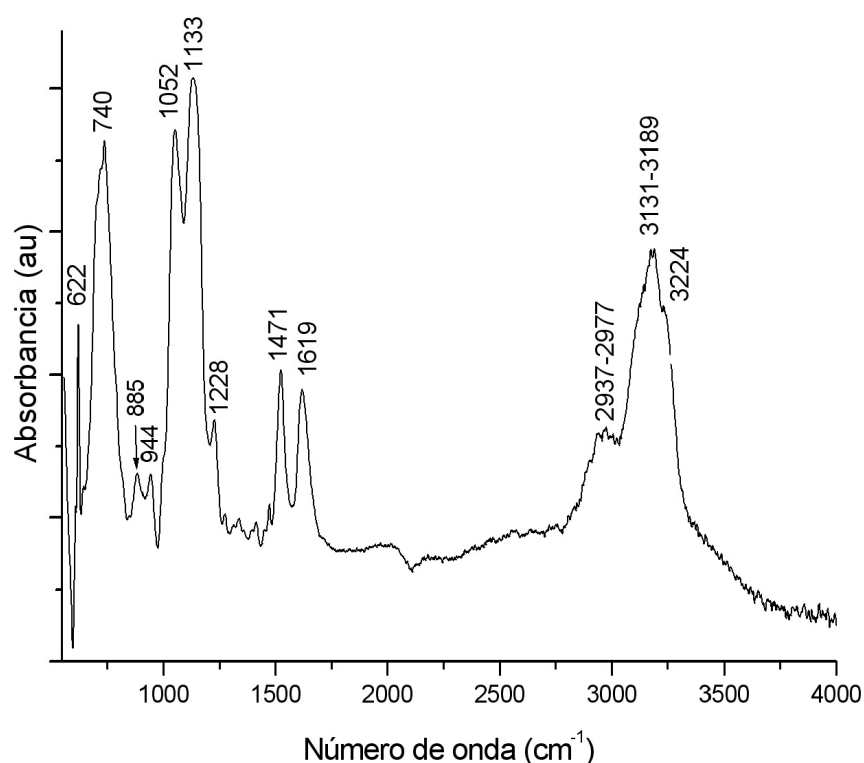


Figura 5.35: Espectro de FTIR de un sustrato de silicio macroporoso funcionalizado por TACVD en condiciones de referencia durante 20 min.

Las diferencias son significativas respecto a los espectros obtenidos sobre silicio monocristalino y silicio nanoestructurado (figuras 5.31 y 5.33). Lo primero que se puede destacar es que en el espectro no aparecen las bandas de absorción propias del silicio poroso (como por ejemplo SiH_x), y que las bandas que aparecen como consecuencia del proceso de TACVD son diferentes de las presentes en el resto de sustratos, tanto en forma como en intensidad. La intensidad del pico correspondiente a la vibración δ de los grupos amino es muy superior a la obtenida sobre silicio

monocristalino y silicio nanoestructurado y no se observa la banda de absorción correspondiente a grupos amino asociados ($=\text{NH}/\text{NH}_3^+$). Por otro lado, el doblete 1052-1133 cm^{-1} está claramente diferenciado, lo que significa que la longitud de la cadena formada por los polímeros de APTS es mayor que la resultante sobre los otros dos sustratos.

En resumen, los análisis de FTIR muestran la presencia de capas orgánicas sobre los tres tipos de sustratos estudiados: silicio monocristalino, nanoestructurado y macroporoso. Aunque las contribuciones principales son muy similares en los tres casos, se han encontrado diferencias relacionadas con el grado de descomposición y policondensación del APTS, así como en la intensidad de las bandas asociadas a grupos NH_2 , especialmente destacadas en el caso de los sustratos de silicio macroporoso. Por otro lado, el estudio de la influencia de los parámetros de deposición muestra diferencias entre el silicio monocristalino y el silicio nanoestructurado, poniendo de manifiesto que los valores que dan como resultado condiciones óptimas son diferentes para cada sustrato.

5.3.3.3. Análisis de XPS.

El análisis de las muestras resultantes del proceso de TACVD mediante XPS permite estudiar la composición superficial y distinguir determinadas estructuras, como es el caso de las aminas secundarias y las aminas protonadas, cuyas bandas de absorción coinciden en FTIR. Como punto de partida, se han estudiado las películas resultantes tras funcionalizar sustratos de silicio monocristalino en condiciones de referencia. Como se explicó en el apartado 2.4.5, los espectros se han obtenido para cada muestra en su estado original y después de un bombardeo con iones de argón durante 0.5, 1, 5, 10 y 15 minutos. En todos los casos, los elementos obtenidos son los mismos que los que componen la molécula de APTS: Si, O, C y N, aunque el porcentaje atómico en que se encuentran varía dependiendo del tiempo de bombardeo, como se muestra en la figura 5.36. Esta variación de los porcentajes atómicos es mayor durante los primeros dos minutos de bombardeo con iones de argón, siendo prácticamente inexistente en adelante. La medida inicial, correspondiente a la muestra en su estado original sin bombardeo previo, es la que presenta una mayor variación en la composición, con una cantidad de C casi un 20% superior a la que se encuentra a partir de 2 minutos. Esto se

explica por la incorporación de C procedente de la exposición de las muestras al ambiente desde su fabricación hasta su análisis. Este mismo comportamiento, se ha observado en todas las muestras analizadas, por lo que el análisis de los espectros de alta resolución asociado a cada elemento se hizo tras 5 minutos de bombardeo, tiempo óptimo para eliminar dicho C adventicio y a partir del cual todas las muestras analizadas presentan una concentración prácticamente constante.

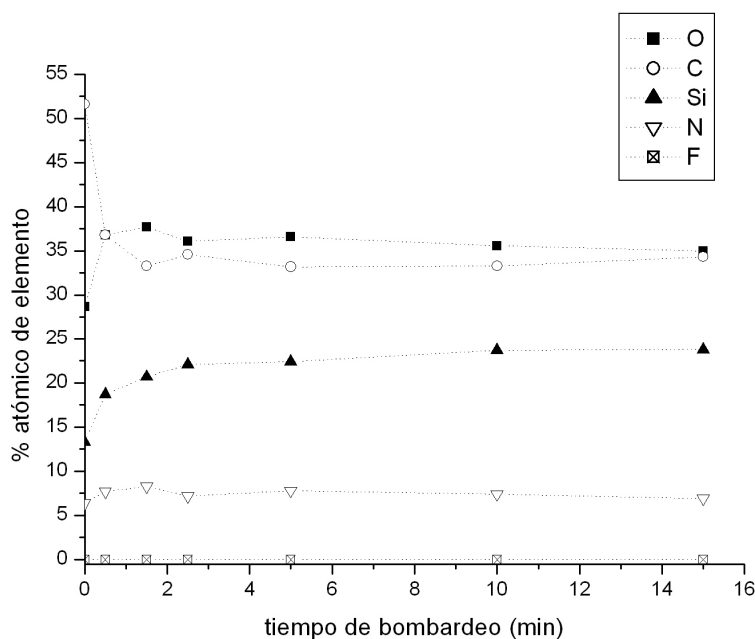


Figura 5.36: Porcentajes atómicos en función del tiempo de bombardeo de iones de Ar^+ para sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD en condiciones de referencia.

La figura 5.37 muestra los espectros de alta resolución correspondientes a los distintos elementos presentes en las películas funcionales, así como su descomposición en las distintas contribuciones, para un sustrato de silicio monocristalino funcionalizado en condiciones de referencia durante 20 minutos. El pico correspondiente al Si 2p, se descompone en dos contribuciones centradas en 100.8 eV y 102.8 eV. Estas energías de enlace se corresponden con los estados asociados a subóxidos de silicio, Si^+ y Si^{3+} , respectivamente.

El pico del C 1s está formado por tres componentes centradas en 285, 286.1 y 283.4 eV, correspondientes a compuestos hidrocarbonados, a enlaces C-N o C-O y a enlaces Si-C, respectivamente [24, 25]. Las dos primeras componentes se encontraron también en los sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno, mientras que la componente Si-C aparece solamente en los sustratos funcionalizados mediante TACVD. Esta componente puede relacionarse

con las estructuras Si-CH₃ encontradas en los espectros de FTIR y que ponen de manifiesto la descomposición del APTS. El pico correspondiente al O 1s está centrado en torno a 533 eV. Este pico presenta una notable anchura y asimetría que permite descomponerlo en hasta 5 componentes, comprendidas entre 530.6 y 534.2 eV. Estas componentes se pueden asociar a SiO₂, distintos subóxidos y estructuras R-O-Si (R = C o Si). Sin embargo, el hecho de que las distintas contribuciones presenten un elevado solapamiento entre sí, dificulta la deconvolución del pico y la asignación de sus contribuciones, por lo que en las muestras sucesivas los estados correspondientes al oxígeno se estudiarán a partir de su asociación con los elementos restantes.

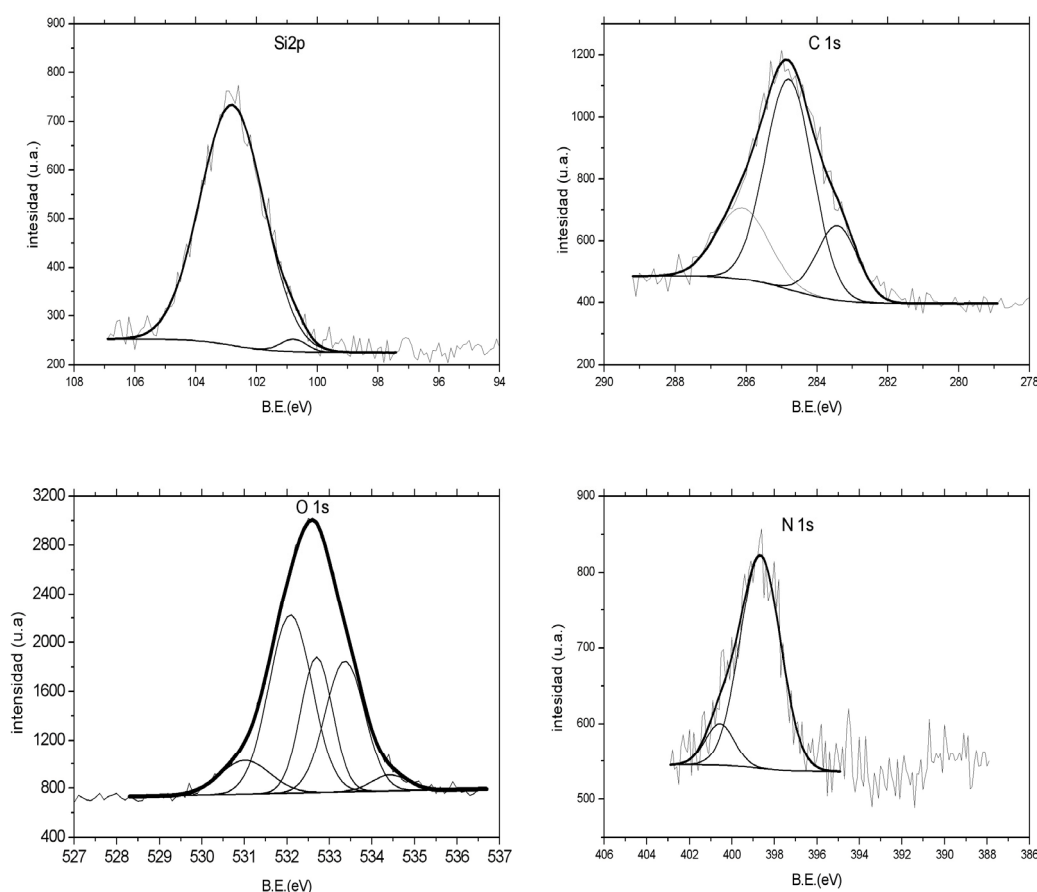


Figura 5.37: Espectros de alta resolución correspondiente a los elementos presentes en los sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD en condiciones de referencia durante 20 min, obtenidos tras 5 min de bombardeo con Ar⁺.

La ventana del N 1s, muestra un pico que se puede descomponer en dos contribuciones, 398.7 eV y 400.6 eV, asignadas a grupos amino (–NH₂) y a aminas secundarias (=NH). Como se vio en los espectros de FTIR (figura 5.32), la vibración δ de los grupos amino estaba formada por dos contribuciones, una asociada a grupos NH₂

y otra que se podía asignar a aminas protonadas o a aminas secundarias. Esta segunda componente no podía identificarse con precisión en infrarrojo puesto que sus bandas aparecen en el mismo rango de energía. Sin embargo, los experimentos de XPS sí permiten diferenciarlas al encontrarse las dos componentes a energías de enlace distintas: 400.6 eV, en el caso de las aminas secundarias y 401.3 eV, en el caso de las aminas protonadas.

Es interesante destacar que el estudio de la evolución de las dos contribuciones al pico N 1s en función del tiempo de bombardeo es distinta. La componente asociada a grupos NH_2 permanece fija en 399 eV, mientras que la segunda componente se desplaza desde 401.3 eV, para el estado original antes del bombardeo, hasta 400.6 eV a partir de cinco minutos de bombardeo. Esto significa que esta segunda componente corresponde a NH_3^+ en superficie y según se analizan zonas más internas de la muestra se desplaza hacia valores correspondientes a aminas secundarias, por lo que la banda de infrarrojo correspondiente será una superposición de ambas.

Por último, el porcentaje asociado a cada contribución en los distintos elementos, se muestra en la tabla 5.12. El nitrógeno se encuentra en forma de grupos amino (NH_2) mayoritariamente (85% del total) en los espectros obtenidos tras 5 minutos de bombardeo. La evolución de este porcentaje en función del tiempo de bombardeo muestra que la superficie de la película sin realizar bombardeo presenta un porcentaje de NH_2 de 73% y que éste va aumentando hasta llegar a un 96% tras dos minutos de bombardeo. Después empieza a disminuir hasta un 66% tras los 15 minutos registrados. El interés de este resultado reside en que demuestra que los grupos amino se encuentran no sólo en superficie sino a lo largo de un determinado espesor, de manera que las películas siguen presentando dichos grupos funcionales aunque la capa más superficial sufra algún tipo de degradación. Esto es una variación interesante respecto a la mayoría de los métodos de biofuncionalización que emplean APTS, en los que se deposita una monocapa externa de NH_2 , cuya degradación implica la pérdida de funcionalidad por parte de las superficies.

Si 2p		C 1s			N 1s	
Si^+ (%)	Si^{3+} (%)	Hidroc. (%)	C-N (%)	C-Si (%)	NH_2 (%)	R-NH (%)
2	98	57	28	15	85	15

Tabla 5.12: Porcentaje de la contribución de los distintos estados químicos resultantes tras funcionalizar por TACVD silicio monocristalino en condiciones de referencia.

A continuación, se ha estudiado la influencia de los parámetros de deposición. En particular, se han escogido las condiciones que presentaban espectros de FTIR (figura 5.32) con las bandas de absorción más intensas, esto es, $T_{\text{evap}} = 190^{\circ}\text{C}$ - $T_{\text{act}} = 750^{\circ}\text{C}$ - $P_{\text{Ar}} = 1$ mbar (*Si190*), $T_{\text{evap}} = 150^{\circ}\text{C}$ - $T_{\text{act}} = 800^{\circ}\text{C}$ - $P_{\text{Ar}} = 1$ mbar (*Si800*) y $T_{\text{evap}} = 150^{\circ}\text{C}$ - $T_{\text{act}} = 750^{\circ}\text{C}$ - $P_{\text{Ar}} = 0.4$ mbar (*Si0.4*).

Como en los sustratos de **silicio monocristalino** funcionalizados en condiciones de referencia, el estudio de las contribuciones en que aparecen los distintos elementos al variar los parámetros de funcionalización se ha realizado a partir de los espectros de XPS de alta resolución medidos tras 5 minutos de bombardeo. En la tabla 5.13 se recogen las contribuciones y el porcentaje de cada una de ellas al pico del Si 2p.

Si 2p	Si190 (%)	Si800 (%)	Si0,4 (%)	Estado
Si ₁ , eV	103,2 (100)	103,2 (100)		SiO ₂
Si ₂ , eV			103,6 (41)	Si ⁴⁺
Si ₃ , eV			102,5 (33)	Si ³⁺
Si ₄ , eV			101,1 (5)	Si ²⁺
Si ₅ , eV			97,3 (18)	2p _{3/2}
Si ₆ , eV			98,3 (3)	2p _{1/2}

Tabla 5.13: Contribuciones al pico de Si 2p para sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD con distintas condiciones. Entre paréntesis el porcentaje de cada una de ellas respecto al total.

Las muestras Si190 y Si800 presentan una única componente centrada en 103.2 eV, correspondiente a SiO₂. Sin embargo, la muestra Si0.4 presenta dos picos bien definidos centrados en 99.0 y 103.0 eV, respectivamente. El pico de menor energía muestra dos contribuciones en 97.3 y 98.3 eV, asignables al doblete 2p_{3/2} y 2p_{1/2} del estado no oxidado del Si, aunque ambos valores aparecen desplazados 0.6 eV respecto a los valores teóricos (apartado 3.2.2 y 4.3.2). El pico centrado en 103.0 eV se descompone a su vez en tres contribuciones a 101.1, 102.5 y 103.6 eV, que se corresponden con los estados de oxidación Si²⁺, Si³⁺ y Si⁴⁺, respectivamente. Esto supone una diferencia significativa, pues mientras que en las muestras Si190 y Si800, ambas obtenidas con una $P_{\text{Ar}} = 1$ mbar, el silicio presente está esencialmente en forma de óxido, en la muestra Si0.4, cuya P_{Ar} es 0.4 mbar, se observa además la presencia de estados no oxidados del Si. Esta contribución correspondiente a estados no oxidados debe provenir del sustrato. Sin embargo, en las películas asociadas a Si190, que tienen

un espesor menor (figura 5.13), no se ha detectado la señal del sustrato, lo que indica que la velocidad de arranque de material es mayor en el caso de la muestras $P = 0.4$ mbar. Este comportamiento puede relacionarse con el hecho de las muestras Si0.4, presentaban un espectro de FTIR (figura 5.32) más parecido al APTS y asociado por tanto a una menor activación del APTS.

A continuación se ha estudiado el pico del C 1s (tabla 5.14). En las tres muestras analizadas, Si800, Si190 y Si0.4, se encuentran las mismas contribuciones, asignadas a las siguientes componentes: compuestos hidrocarbonados (285.0 eV), enlaces C-N y C-O (286.4 eV) y C-Si (282.9 eV). En todos los casos, la componente asociada a compuestos hidrocarbonados es la que se encuentra en mayor proporción.

C 1s	Si190 (%)	Si800 (%)	Si0,4 (%)	Estado
C ₁ , eV	285,0 (61)	285 (77)	285 (68)	Compuestos hidrocarbonados.
C ₂ , eV	286,4 (4)	286,8 (16)	286,7 (21)	Enlaces C-N y C-O
C ₃ , eV	282,9 (35)	283 (7)	282,5 (11)	C-Si

Tabla 5.14: Contribuciones al pico de C 1s para sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD con distintas condiciones. Entre paréntesis el porcentaje de cada una de ellas respecto al total.

Por último, el análisis del pico N 1s (tabla 5.15), permite la deconvolución en dos componentes para las tres películas estudiadas, la más importante, centrada en 399 eV y asociada a grupos amino. La segunda componente varía su posición, dependiendo de las condiciones de funcionalización. Así, en las muestras Si190 y Si0.4, aparece centrada en valores de energía de enlace correspondientes a aminas secundarias, mientras que en Si800 aparece desplazada a energías mayores, correspondiendo a NH_3^+ . Por otra parte, la muestra Si0.4 presenta un segundo pico en 395.1 eV, cuya asignación no está muy clara. No obstante, su contribución es tan sólo del 3%. Es interesante destacar que en todas las muestras la componente asociada a grupos amino es la más importante, salvo en el caso de Si0.4 en que es menor de 50%.

N 1s	Si190 (%)	Si800 (%)	Si0,4 (%)	Estado
N ₁ , eV	399,1 (70)	399 (80)	399,3 (43)	NH ₂
N ₂ , eV	399,9 (30)		398,9 (54)	R-NH
N ₃ , eV		401,3 (20)		NH ₃ ⁺
N ₄ , eV			395,1 (3)	

Tabla 5.15: Contribuciones al pico N 1s para sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD con distintas condiciones. Entre paréntesis el porcentaje de cada una de ellas respecto al total.

El análisis de la evolución con el tiempo de bombardeo de la posición a la que aparece la segunda componente, asociada a NH_3^+ o aminas secundarias, muestra que la posición del pico se desplaza a energías de enlace menores, desde valores correspondientes a NH_3^+ (401.3 eV) a valores correspondientes a aminas secundarias (398.9 eV) en todos los casos estudiados. La diferencia entre las distintas condiciones de funcionalización está en el tiempo de bombardeo necesario para observar dicho desplazamiento. En concreto, en algunos casos como las muestras Si190 o Si0.4, no llega a detectarse la componente asociada a grupos NH_3^+ en ninguno de los espectros medidos.

A partir de los porcentajes atómicos de los distintos elementos correspondientes a estas muestras, se ha calculado la concentración y la estequiometría correspondiente (tabla 5.16). Los valores se han calculado tanto en superficie como realizando el promedio de los valores obtenidos a partir de 2 minutos de bombardeo, en los que la concentración permanece prácticamente constante.

	Superficie					Promedio				
	O (%)	C (%)	Si (%)	N (%)	Estequiometría	O (%)	C (%)	Si (%)	N (%)	Estequiometría
Si190	31,7	52,1	12,5	3,7	$\text{Si}_3\text{O}_9\text{C}_{14}\text{N}$	31,3	36,0	23,0	9,8	$\text{Si}_2\text{O}_3\text{C}_4\text{N}$
Si800	24,4	56	11	6,4	$\text{Si}_2\text{O}_9\text{C}_4\text{N}$	20,8	37,7	21,4	8,7	$\text{Si}_3\text{O}_3\text{C}_5\text{N}$
Si0,4	30,4	50,6	11,3	7,3	$\text{Si}_2\text{O}_4\text{C}_7\text{N}$	29,3	38,8	20,1	9,8	$\text{Si}_2\text{O}_3\text{C}_4\text{N}$
Si CE	28,7	51,6	13,3	6,4	$\text{Si}_2\text{O}_4\text{C}_8\text{N}$	35,8	33,9	23,0	7,3	$\text{Si}_3\text{O}_5\text{C}_5\text{N}$

Tabla 5.16: Composición y estequiometría de los sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD en distintas condiciones.

Los valores anteriores muestran que las diferencias más significativas de unas condiciones de funcionalización a otras se producen en superficie, mientras que los valores obtenidos al promediar las composiciones de los espectros medidos tras un tiempo de bombardeo superior a 2 minutos son todos muy similares. Aunque este comportamiento es el esperado, puesto que las variaciones en superficie se relacionan con la contaminación ambiental que se incorpora a las muestras, las diferencias observadas son de gran interés debido a que la superficie es la parte de las películas que entra en contacto con los diversos sistemas biológicos y por tanto sus propiedades son las que determinan su biofuncionalidad. Estas diferencias son especialmente relevantes en los porcentajes de N, que varían desde 7.3 hasta 3.7%. Por otra parte, es interesante

destacar que la relación Si/N pone de manifiesto la descomposición de la cadena aminopropil, de acuerdo a los resultados obtenidos por RBS y ERDA.

A continuación, se ha repetido el estudio sobre **sustratos de silicio nanoestructurado (SP_n)** comenzando por los sustratos funcionalizados en condiciones de referencia. Los elementos encontrados son Si, O, C y N, componentes de la molécula de APTS. De la misma forma que ocurría en las películas depositadas sobre silicio monocristalino, la variación del porcentaje atómico con el tiempo de bombardeo es especialmente significativa en los primeros 30 segundos, como consecuencia del C adventicio (figura 5.38). Trascurrido ese tiempo, dichos porcentajes permanecen prácticamente constantes.

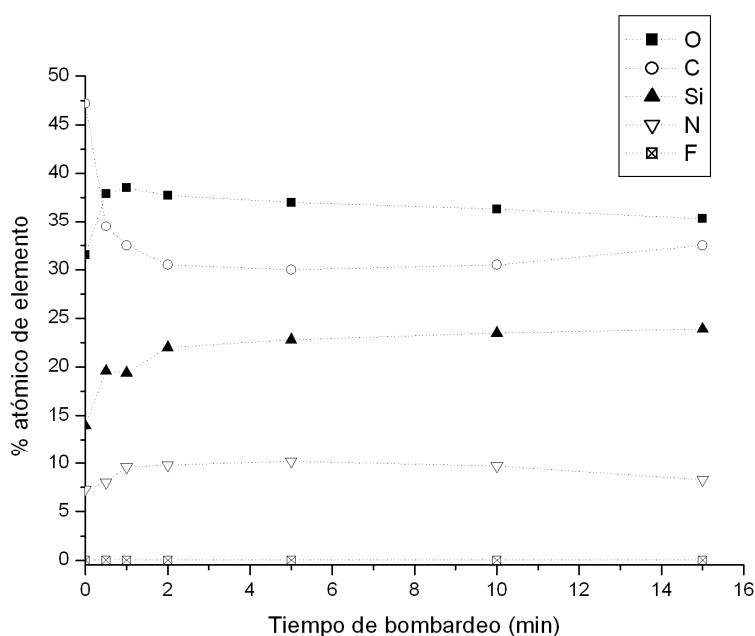


Figura 5.38: Porcentajes atómicos obtenidos en función del tiempo de bombardeo para sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados en condiciones de referencia.

Los espectros de alta resolución de cada uno de los elementos medidos tras 5 minutos de bombardeo se muestran en la figura 5.39. El pico del Si 2p se puede descomponer en dos contribuciones, 101.1 y 102.7 eV, correspondientes a los estados de oxidación Si^{2+} y Si^{3+} , respectivamente. La componente asociada a estructuras Si-O-C, relacionada con los grupos Si-OEt de la molécula de APTS sin hidrolizar, presente en los sustratos de SP_n funcionalizados por inmersión (figura 4.17) no aparecen tras el proceso de funcionalización por TACVD.

El pico del C 1s muestra dos contribuciones, centradas en energías de enlace 285.0 y 287.2 eV, correspondientes a compuestos hidrocarbonados y enlaces C-N o C-O, respectivamente. A diferencia de los sustratos de silicio monocristalino (tabla 5.14), no aparece la contribución asociada a enlaces C-Si, lo que está en concordancia con los resultados obtenidos por FTIR (apartado 5.3.3.2) que mostraban que las moléculas de APTS sufrían una menor descomposición al depositarlas sobre silicio nanoestructurado que sobre silicio monocristalino. Por último, el pico correspondiente al N 1s, se descompone en otras dos contribuciones, 398.7 eV, asociada a grupos amino (-NH_2) y 400.4 eV, asociada a aminas secundarias (=NH). La proporción en que cada una de las distintas asignaciones contribuye a su pico correspondiente, se muestra en la tabla 5.17.

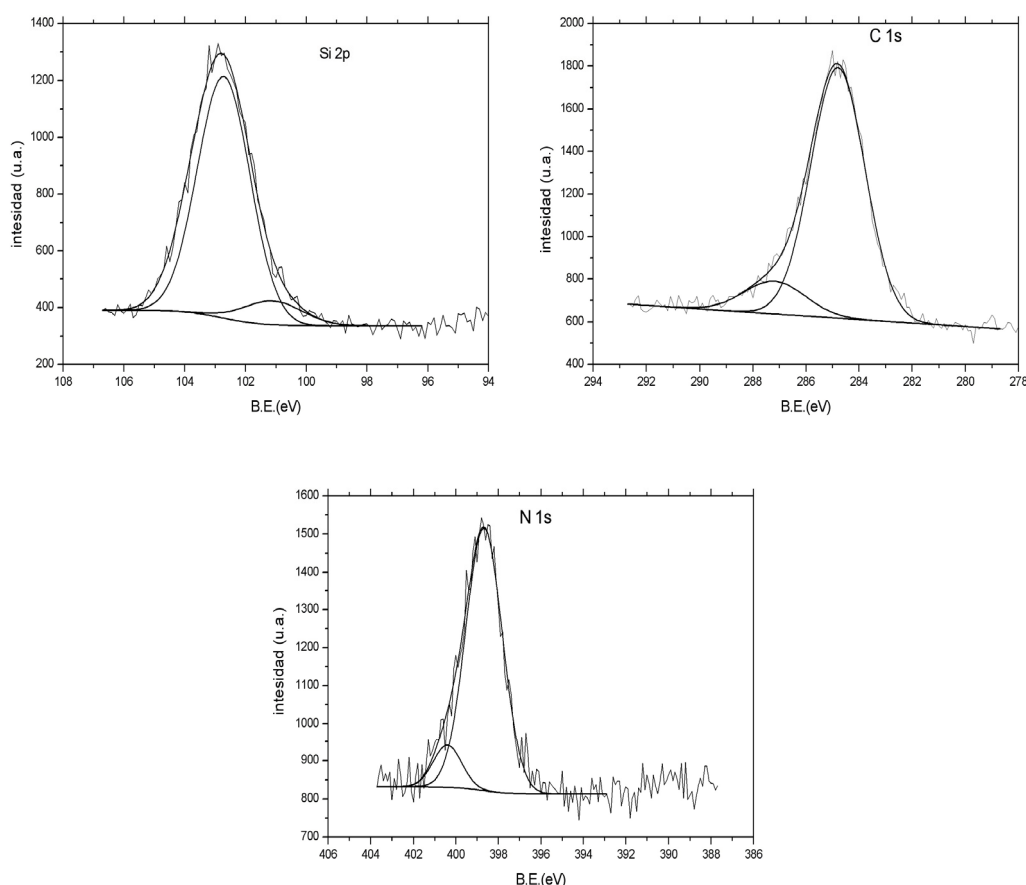


Figura 5.39: Espectros de alta resolución correspondientes a un sustrato de silicio nanoestructurado funcionalizado en condiciones de referencia, obtenidos tras 5 min de bombardeo con iones de Ar^+ .

Si 2p		C 1s		N1s	
Si^{2+} (%)	Si^+ (%)	Hidroc. (%)	C-N (%)	NH_2 (%)	=NH (%)
15	85	82	12	89	11

Tabla 5.17: Porcentaje de la contribución de los distintos estados químicos resultantes tras funcionalizar silicio nanoestructurado en condiciones de referencia.

La diferencia fundamental observada en los sustratos de silicio nanoestructurado respecto a los sustratos de silicio monocristalino, funcionalizados en ambos casos en condiciones de referencia, es la ausencia de la componente correspondiente a enlaces Si-C. Esta ausencia da lugar a que la contribución asociada a compuestos hidrocarbonados tenga más peso, y a que el porcentaje de Si con estado de oxidación Si^{3+} sea menor en silicio nanoestructurado que en silicio monocristalino. Este comportamiento se puede relacionar a su vez con el hecho de que el APTS se descomponga menos, como se vio por FTIR.

La influencia de los parámetros de funcionalización se ha estudiado para las siguientes condiciones: $T_{\text{evap}} = 190\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $T_{\text{act}} = 750\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $P_{\text{Ar}} = 1\text{ mbar}$ (SP_n190), $T_{\text{evap}} = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $T_{\text{act}} = 800\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $P_{\text{Ar}} = 1\text{ mbar}$ (SP_n800) y $T_{\text{evap}} = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $T_{\text{act}} = 750\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $P_{\text{Ar}} = 0.4\text{ mbar}$ ($SP_n0.4$).

Las componentes asociadas a cada uno de los elementos se obtuvieron a partir de los espectros de alta resolución medidos tras cinco minutos de bombardeo. En la tabla 5.18 se muestran las componentes resultantes de la deconvolución del pico Si 2p.

Si 2p	Si190 (%)	Si800 (%)	Si0,4 (%)	Estado
Si ₁ , eV	103,3 (90)	103,3 (95)	103,2 (100)	SiO ₂
Si ₂ , eV	101,1 (10)	100,9 (5)		Si ⁺

Tabla 5.18: Contribuciones al pico Si 2p encontradas en los sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD en distintas condiciones. Entre paréntesis el porcentaje de cada una de ellas respecto al total.

Las muestras SP_n190 y SP_n800 presentan una componente fundamental centrada en 103.3 eV y asociada a SiO_2 y un segundo pico en energías de enlace menores, 101.1 eV, que corresponde a Si^+ . Las muestras correspondientes a las mismas condiciones de funcionalización, empleando sustratos de silicio monocristalino sólo mostraban la presencia de la componente correspondiente al óxido de silicio. En la muestra $SP_n0.4$ se aprecia la existencia de un único pico en 103.2 eV que indica que el silicio se encuentra mayoritariamente formando SiO_2 . En este caso no se observan contribuciones asociadas a estados no oxidados del silicio. Esto se relaciona con el hecho observado por FTIR de que el comportamiento de la muestra obtenida tras funcionalizar SP_n con $P = 4\text{ mbar}$ se correspondía con el de la muestra obtenida tras funcionalizar silicio monocristalino con $P = 0.4\text{ mbar}$.

Las contribuciones obtenidas tras la deconvolución del pico C 1s se muestran en la tabla 5.19. El pico de la muestra SP_n190 se puede descomponer en 3 componentes: la componente principal, 285 eV, corresponde a un compuesto hidrocarbonado, mientras que la centrada en 287.3 podría corresponder a enlaces tipo C-N, C-O, COH, COC, especialmente C-O, pese a que dicho pico se encontraría ligeramente desplazado respecto de sus valores teóricos (286-286,5 eV). Finalmente, la última componente que aparece en 288.4 eV tiene una contribución del 14% al pico total y podría relacionarse bien la presencia de enlaces tipo C=O, sugiriendo la existencia de amidas, o bien la existencia de posibles enlaces C-F. Sin embargo ninguna de estas asignaciones se corrobora en los espectros de FTIR.

C 1s	Si190 (%)	Si800 (%)	Si0,4 (%)	Estado
C ₁ , eV	285 (79)	285 (75)	285 (64)	Compuestos hidrocarbonados.
C ₂ , eV	287,3 (7)	286,5 (23)	286,3 (31)	Enlaces C-N, C-O, COH
C ₃ , eV		282,4 (2)	283,2 (5)	C-Si
C ₄ , eV	288,4 (14)			

Tabla 5.19: Contribuciones al pico C 1s encontradas en los sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD en distintas condiciones. Entre paréntesis el porcentaje de cada una de ellas respecto al total.

Las muestras SP_n800 y SP_n0.4 presentan un comportamiento análogo entre sí y análogo a su vez a los sustratos de silicio monocristalino, con tres contribuciones correspondientes a los compuestos hidrocarbonados, a enlaces con N o C, y en menor proporción a la presencia de enlaces C-Si en forma de carburos.

Para terminar, las contribuciones obtenidas tras la deconvolución del pico N 1s se muestran en la tabla 5.20.

N 1s	SP190 (%)	SP800 (%)	SP0,4 (%)	Estado
N ₁ (eV)	398,9 (91)	399 (96)	399 (87)	NH ₂
N ₂ (eV)	401,2 (9)	401,5 (4)	400,9 (13)	NH ₃ ⁺

Tabla 5.20: Contribuciones al pico N 1s encontradas en los sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD en distintas condiciones. Entre paréntesis el porcentaje de cada una de ellas respecto al total.

En las tres muestras estudiadas, se encuentran dos contribuciones que corresponden a grupos amino (NH₂) y a aminas protonadas (NH₃⁺), siendo la componente de más peso la asociada a grupos amino. Es interesante destacar que el porcentaje de N formando grupos amino es mayor en silicio nanoestructurado que en el

caso de los sustratos de silicio monocristalino tras ser sometidos al proceso de TACVD. Sin embargo, la funcionalización por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno (apartado 4.3), daba el resultado contrario, siendo la componente asociada a grupos amino mayor en los sustratos de silicio monocristalino. Este hecho se comprobó también en los espectros de FTIR (figura 5.34), en los que la banda asociada a la vibración δ de los NH_2 era de mayor intensidad que la asociada a aminas secundarias.

Para finalizar el estudio de la influencia de los parámetros de funcionalización en las películas funcionales depositadas sobre sustratos de SP_n , se ha calculado la estequiometría a partir de los porcentajes atómicos obtenidos. Como en el caso de los sustratos de silicio monocristalino, se ha calculado el valor correspondiente a la muestra en su estado original, y el promedio una vez que los porcentajes se estabilizan, lo que ocurre tras 2 minutos de bombardeo. Los resultados se muestran en la tabla 5.21. Como en los sustratos de silicio monocristalino, la mayor variación de unas condiciones a otras se produce en superficie. El porcentaje de nitrógeno es mayor en los sustratos de SP_n que en los de silicio monocristalino. En los valores en promedio se obtiene una menor concentración de C en general.

	Superficie					Promedio				
	O (%)	C (%)	Si (%)	N (%)	Estequiometría	O (%)	C (%)	Si (%)	N (%)	Estequiometría
SP190	31,8	47,2	12,7	6,0	$\text{Si}_2\text{O}_5\text{C}_8\text{N}$	38,7	26,8	22,8	8,0	$\text{Si}_3\text{O}_5\text{C}_3\text{N}$
SP800	32,1	43,2	15,8	8,9	$\text{Si}_2\text{O}_4\text{C}_5\text{N}$	33,25	31	22,775	10,6	$\text{Si}_2\text{O}_3\text{C}_3\text{N}$
SP0,4	26,6	53,1	11,7	7,7	$\text{Si}_2\text{O}_3\text{C}_7\text{N}$	31,9	30,9	22,9	10,9	$\text{Si}_2\text{O}_3\text{C}_3\text{N}$
SP CE	31,5	47,2	14,0	7,3	$\text{Si}_2\text{O}_4\text{C}_6\text{N}$	37,0	31,2	22,3	9,5	$\text{Si}_2\text{O}_4\text{C}_3\text{N}$

Tabla 5.21: Composición y estequiometría de los sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD en distintas condiciones.

Finalmente, se ha realizado el estudio de las películas obtenidas sobre sustratos de **silicio macroporoso**, analizando un sustrato funcionalizado en condiciones de referencia durante 20 minutos. La evolución de la concentración de los distintos elementos en función del tiempo de bombardeo, se recoge en la figura 5.40. Como en el resto de muestras estudiadas, la composición presenta una mayor variación en los primeros dos minutos y luego permanece prácticamente constante.

Los espectros de alta resolución de los elementos presentes en la película funcional, Si, C, O y N, se muestran en la figura 5.41. El pico del Si 2p presenta dos contribuciones, una centrada en 100.2 eV, correspondiente a Si^+ , y otra en 102.8 eV, correspondiente a Si^{3+} .

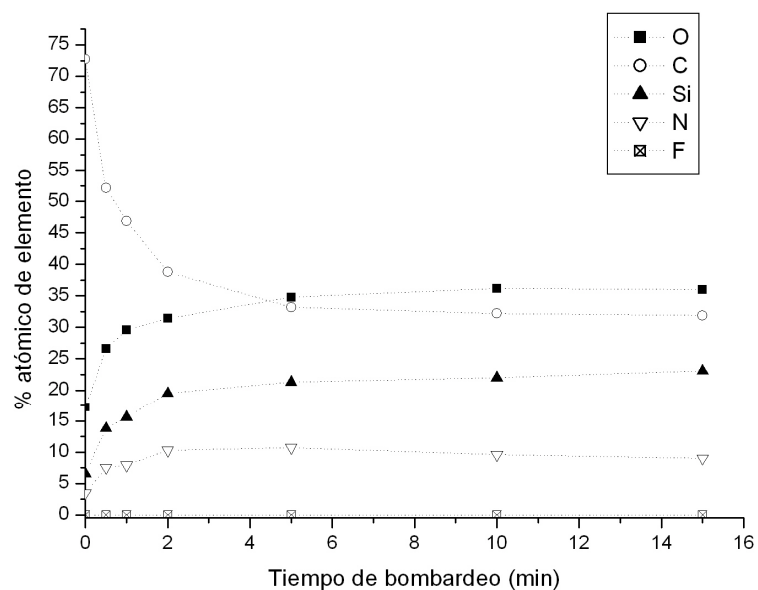


Figura 5.40: Porcentajes atómicos obtenidos en función del tiempo de bombardeo para sustratos de silicio macroporoso funcionalizados por TACVD en CR.

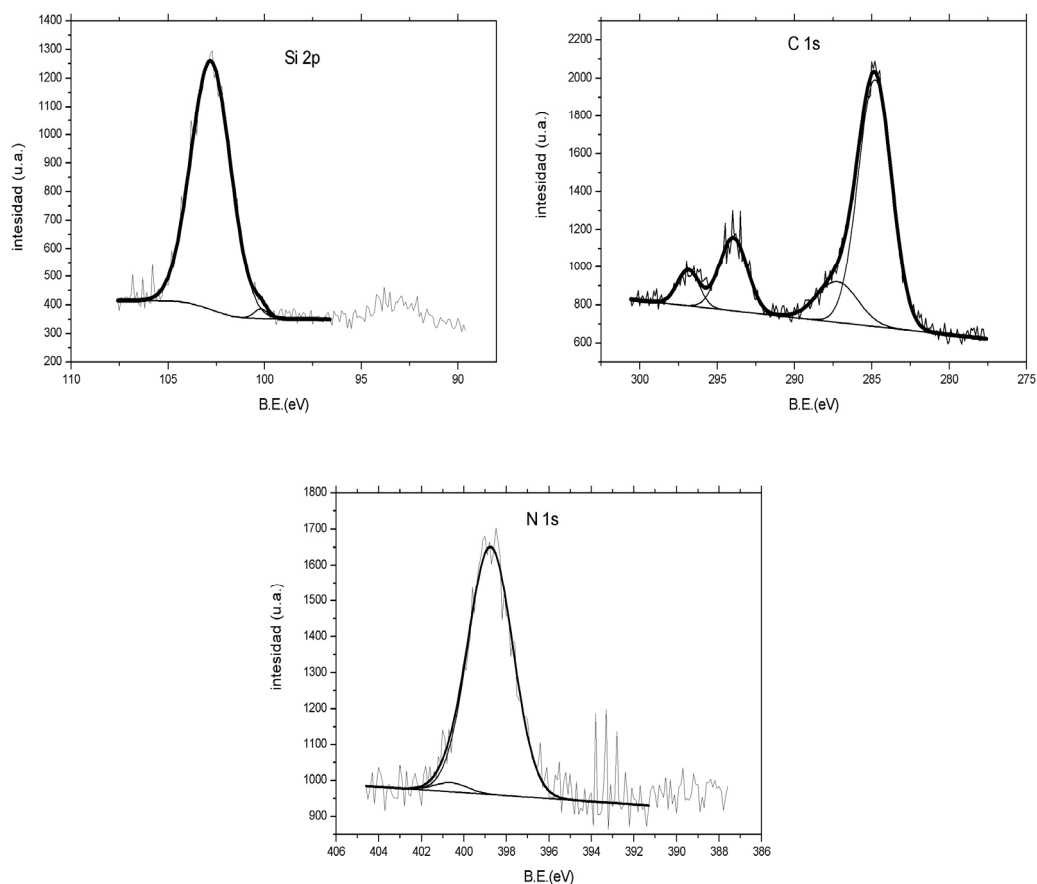


Figura 5.41: Espectros de alta resolución correspondientes a un sustrato de silicio macroporoso funcionalizado por TACVD en condiciones de referencia.

El pico del C1s presenta tres máximos. La de más baja energía de enlace está formada por dos componentes: 285.0 eV, correspondiente a compuestos hidrocarbonados, y 287.2 eV, correspondiente a enlaces C-N o C-O, y que son las mismas que se encontraron en los sustratos de silicio monocristalino y silicio nanoestructurado. Además, ahora aparecen dos nuevas componentes: la primera, centrada en 294 eV, correspondiente a enlaces CF y la segunda, centrada en 296.9 eV, cuya asignación ha quedado indeterminada debido a que no se ha encontrado ni presencia de F o Cl ni evidencias de la presencia de compuestos aromáticos C_6H_6 . Por último, el pico del N 1s, presenta las mismas contribuciones halladas en el resto de sustratos: 398.7 y 400.6 eV, correspondientes a $-NH$ y $=NH$, respectivamente.

El porcentaje de cada una de las contribuciones a su pico correspondiente se recoge en la tabla 5.22. Los resultados obtenidos coinciden con los observados en los sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados en las mismas condiciones aunque presentan las siguientes diferencias: las contribuciones asociadas a Si^{3+} y a NH_2 son bastante más elevadas sobre silicio macroporoso y aparecen contribuciones relacionadas con F. Esto podría ser debido a restos de fluor en el interior de los poros procedentes del electrolito de formación del SP_M (figura 3.2) que hayan reaccionado con el C durante el proceso de funcionalización por TACVD.

Si 2p		C 1s				N 1s	
Si^+ (%)	Si^{3+} (%)	Hidroc (%)	C-N (%)	C-F (%) ???	Sat.psi-psi (%) ???	NH_2 (%)	$=NH$ (%)
1	99	65	14	15	6	92	8

Tabla 5.22: Porcentaje de la contribución de los distintos estados químicos resultantes tras funcionalizar silicio macroporoso por TACVD en condiciones de referencia.

Como resumen de los resultados obtenidos en los análisis químicos realizados, se comprueba que la activación térmica en la que se basa la técnica de TACVD da lugar a la descomposición del APTS. Las películas resultantes tienen una elevada concentración de grupos amino, no sólo en superficie sino también en profundidad, lo que asegura la funcionalidad de las muestras aunque se degrade su capa más externa. Las diferencias asociadas a los distintos sustratos se relacionan fundamentalmente con la necesidad de optimizar los parámetros de deposición para cada uno de ellos. En general se ha observado que las estructuras obtenidas sobre silicio nanoestructurado a unas condiciones determinadas se corresponden con las obtenidas sobre silicio a

temperaturas ligeramente inferiores, por ejemplo, $T_{\text{act}} = 750^{\circ}\text{C}$ sobre silicio monocristalino se corresponde con $T_{\text{act}} = 800^{\circ}\text{C}$ sobre silicio nanoestructurado.

5.3.4. Reactividad superficial.

De la misma forma que se hizo en el caso de los sustratos funcionalizados por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno (capítulo 4), el último paso en la caracterización de las películas obtenidas por TACVD ha consistido en evaluar su reactividad superficial, que depende tanto de la concentración de grupos amino en superficie (determinada por XPS) como de la accesibilidad de éstos a las biomoléculas y diversos sistemas biológicos (proteínas, ácidos nucleicos...) con las que van a interaccionar. La evaluación de la reactividad superficial se ha realizado por fluorescencia (apartado 2.4.6) y por absorbancia en el ultravioleta (apartado 2.4.7). En el primer caso, las muestras funcionalizadas se incubaron con isotiocianato de fluoresceína (FITC), molécula fluorescente que reacciona selectivamente con grupos amino. A partir de la fluorescencia de las imágenes realizadas se puede obtener información de la distribución de los grupos amino funcionales y mediante la cuantificación de la intensidad se puede hacer un estudio comparativo entre muestras. El segundo de los métodos empleados para evaluar la reactividad superficial se basa en la reacción de los grupos amino superficiales con nitrobenzaldehído, molécula con una elevada absorbancia en el ultravioleta. Este método permite hacer una cuantificación de los grupos amino reactivos a partir de la ley de Lambert-Beer (2.2).

5.3.4.1. Análisis de fluorescencia.

La funcionalidad de las películas obtenidas mediante TACVD se ha estudiado en función de los parámetros de deposición: temperatura de activación, temperatura de evaporación y presión de argón, sobre sustratos de silicio monocristalino y de silicio nanoestructurado.

Con el fin de poder comparar las distintas imágenes de fluorescencia obtenidas con el microscopio confocal, las condiciones de medida se han fijado a: $L = I = 3$; $G = 0.3$; $Of = 2$ (apartado 2.4.6), obteniendo imágenes con un área de $305 \times 305 \mu\text{m}^2$. Las

imágenes insertadas en el ángulo superior derecho de las figuras corresponden a los controles de silicio monocristalino sin funcionalizar.

En primer lugar, se ha estudiado la influencia de la **temperatura de activación** (T_{act}) sobre sustratos de silicio monocristalino. Las imágenes de fluorescencia obtenidas al funcionalizar sustratos de silicio con diversos valores de T_{act} , fijando el resto de parámetros a los correspondientes a las condiciones de referencia ($T_{evap} = 150^{\circ}\text{C}$ y $P_{Ar} = 1$ mbar), se muestran en la figura 5.42. En todos los casos, salvo en $T_{act} = 650^{\circ}\text{C}$, la intensidad de fluorescencia obtenida es considerablemente superior a la del control correspondiente, lo que pone de manifiesto que existe una temperatura de activación mínima por debajo de la cual las capas depositadas apenas son funcionales, mientras que por encima de ella, la intensidad es elevada y prácticamente constante, como se observa en las imágenes correspondientes a 750°C y 800°C . Este comportamiento se corresponde a su vez con las variaciones observadas en las bandas de absorción presentes en los espectros de FTIR (figura 5.32). Por otra parte, la fluorescencia se distribuye uniformemente en la película obtenida a $T_{act} = 750^{\circ}\text{C}$, mientras que para $T_{act} = 800^{\circ}\text{C}$ se reproduce el patrón de capa levantada que ya se observó por SEM (figura 5.12).

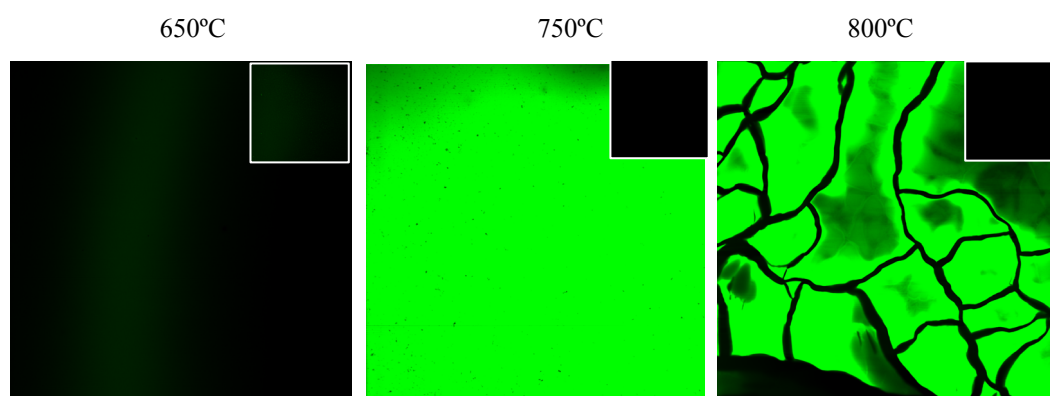


Figura 5.42: Imágenes de confocal correspondientes a sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD a distintas temperaturas de activación.

Las imágenes correspondientes a sustratos de silicio monocristalino funcionalizados con distintas **temperaturas de evaporación** (T_{evap}) se muestran en la figura 5.43. Como en los casos anteriores, el resto de parámetros se dejaron fijos a $T_{act} = 750^{\circ}\text{C}$, $P_{Ar} = 1$ mbar y $t_{dep} = 20$ min. La intensidad de fluorescencia obtenida en los sustratos funcionalizados con temperatura de evaporación en el rango $130\text{-}150^{\circ}\text{C}$ es significativamente mayor que la correspondiente al sustrato de silicio monocristalino

control, y presenta una distribución diferente en función de la temperatura, siendo uniforme solamente en el caso de $T_{\text{evap}} = 150^{\circ}\text{C}$. Para temperaturas superiores a 150°C , se produce una disminución en la intensidad de fluorescencia. Es interesante destacar que este rango coincide también con una disminución en la tasa de evaporación (figura 5.13). Además, la fluorescencia de la muestra obtenida con una temperatura de evaporación de 190°C reproduce el patrón de laberintos observado por SEM (figura 5.22), lo que significa que la formación de estrías y laberintos, no sólo modifica la morfología y las propiedades mecánicas de las películas funcionales, sino que además influye en el patrón de fluorescencia.

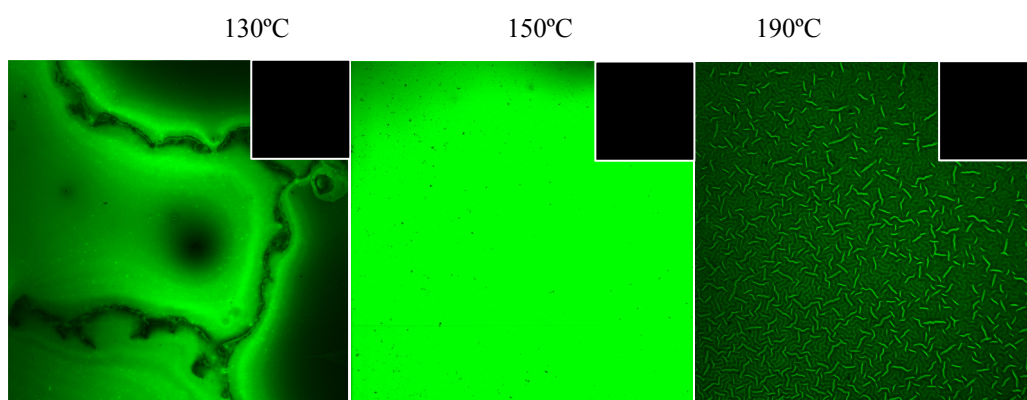


Figura 5.43: Imágenes de confocal correspondientes a sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD a distintas temperaturas de evaporación.

Por último, se ha variado la **presión del gas de arrastre** (P_{Ar}). A partir de las imágenes obtenidas por el microscopio confocal (figura 5.44), se observa que la intensidad de fluorescencia es superior a la del control de silicio monocristalino en todo el rango de presiones estudiado. Para presiones inferiores a 1 mbar, la fluorescencia presenta una distribución poco uniforme a lo largo de la superficie de la muestra, mientras que para presiones superiores a 1 mbar, la distribución de fluorescencia es uniforme pero la intensidad disminuye ligeramente.

Para realizar un estudio comparativo de las imágenes obtenidas por microscopía confocal, se ha realizado la cuantificación de la fluorescencia a partir del histograma de las imágenes correspondientes, obteniendo los resultados que se muestran en la figura 5.45. La intensidad máxima corresponde a las muestras funcionalizadas en condiciones de referencia, puesto que estas condiciones se obtuvieron como resultado de la optimización de las propiedades de funcionalidad de las películas depositadas sobre

silicio monocristalino. La siguiente muestra en intensidad corresponde a $T_{act} = 800^{\circ}\text{C}$, lo que significa que, una vez superada la temperatura mínima de activación, la fluorescencia es prácticamente constante. La temperatura de evaporación es el parámetro que produce una mayor variación en la reactividad de las películas, al variar significativamente la intensidad de la fluorescencia para los distintos valores de temperaturas estudiados.

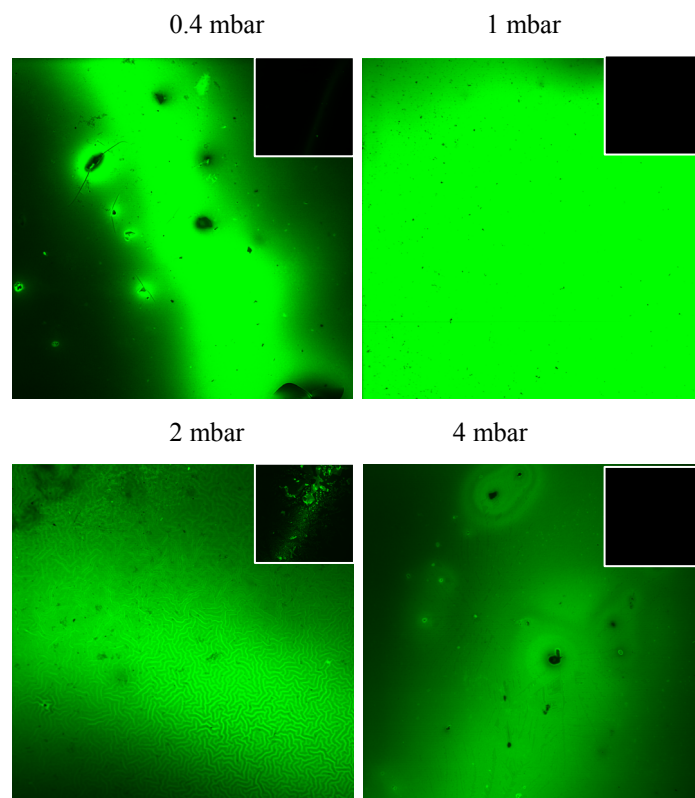


Figura 5.44: Imágenes de confocal correspondientes a sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD a distinta presión de argón.

La concentración de N en forma de grupos amino obtenida por XPS (apartado 5.3.3.3) para las distintas muestras en su estado original es: 4.7% para SiCR, 5.5% para Si800, 3.2% para Si190 y 4% para Si0.4. Si se comparan los valores obtenidos por XPS y los valores de intensidad de fluorescencia para las distintas condiciones, se observa un desajuste en la tendencia que siguen, lo que pone de manifiesto la influencia de otros factores, a parte de la concentración de grupos amino, tales como la orientación de los grupos funcionales en la superficie.

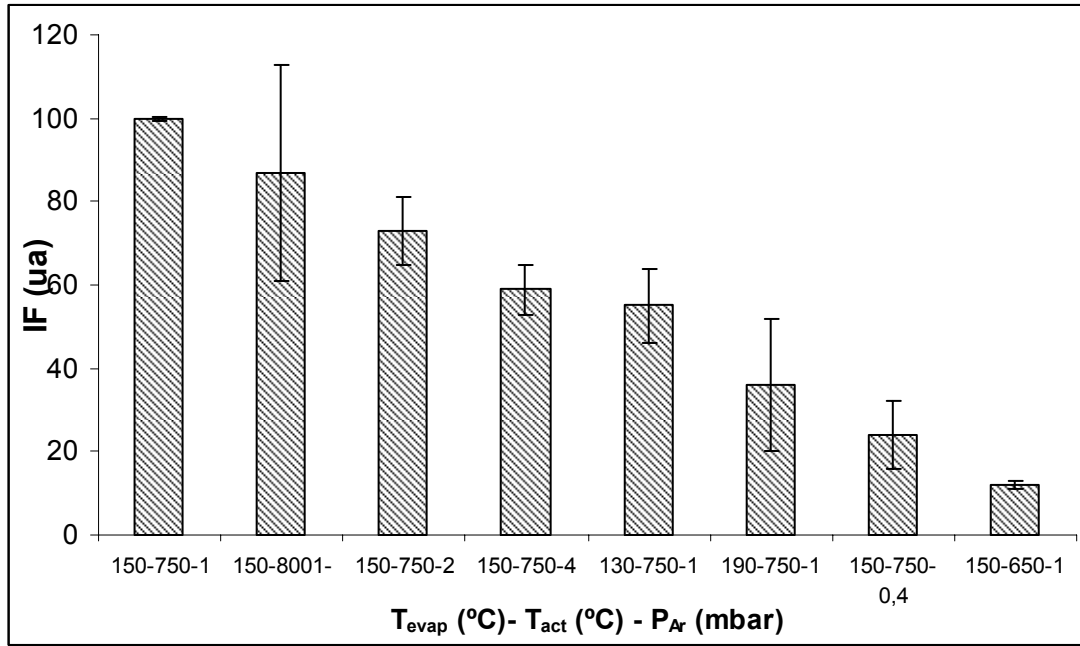


Figura 5.45: Intensidad de fluorescencia de los sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TACVD en las condiciones estudiadas, ordenados de mayor a menor intensidad de fluorescencia (IF).

Los ensayos de reactividad superficial sobre **silicio nanoestructurado (SP_n)** se han realizado por microscopía confocal, fijando las condiciones de medida a los siguientes valores: $L = I = 3$; $G = 1$; $Of = 0$ (apartado 2.4.6). Las imágenes corresponden a una superficie de $305 \times 305 \mu\text{m}^2$ y los controles (imágenes insertadas en el ángulo superior derecho) corresponden a sustratos de SP_n sin funcionalizar e incubados con FITC, siempre teniendo en cuenta las consideraciones señaladas en el apartado 3.3.2.

La figura 5.46 muestra las imágenes de fluorescencia correspondientes a los sustratos de SP_n funcionalizados a diferentes **temperaturas de activación (T_{act})** y con el resto de parámetros fijos a: $T_{\text{evap}} = 150^\circ\text{C}$, $P_{\text{Ar}} = 1 \text{ mbar}$ y $t_{\text{dep}} = 20 \text{ min}$. Como en el caso del silicio monocristalino, para $T_{\text{act}} = 650^\circ\text{C}$ la intensidad de fluorescencia es bastante débil, es decir, esta temperatura se encuentra por debajo de la temperatura mínima de activación. Para temperaturas superiores, la intensidad es significativamente mayor, aunque la distribución es poco uniforme, presentando zonas de baja intensidad. En el caso de $T_{\text{act}} = 800^\circ\text{C}$ la capa no se ha resquebrajado, a diferencia de lo observado sobre silicio monocristalino (figura 5.42), aunque sí se observa el comienzo de líneas de fractura, lo que indica que el espesor crítico de las películas crecidas sobre SP_n ($3 \mu\text{m}$) es menor que el de las crecidas sobre silicio monocristalino ($8 \mu\text{m}$).

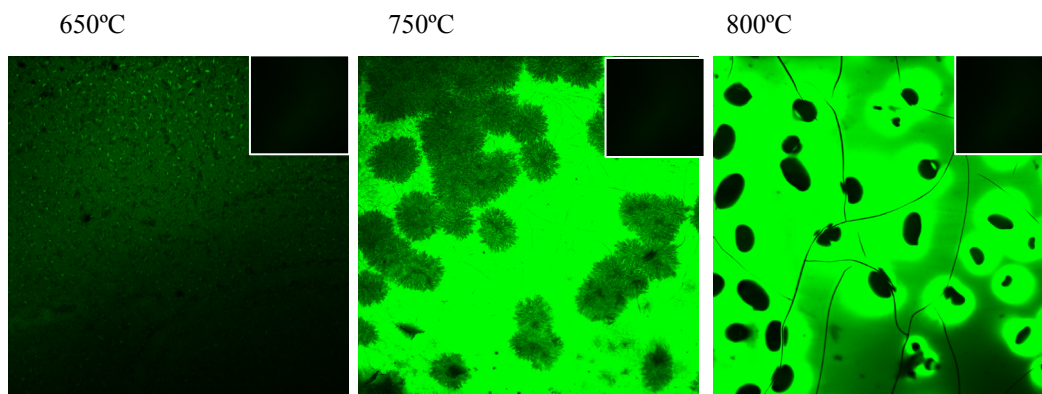


Figura 5.46: Imágenes de confocal correspondientes a sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD con distintas temperaturas de activación.

La figura 5.47 muestra las imágenes de fluorescencia, correspondientes a los sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados a diferentes **temperaturas de evaporación** (T_{evap}), con el resto de parámetros fijos a: $T_{\text{act}} = 750^\circ\text{C}$, $P_{\text{Ar}} = 1 \text{ mbar}$ y $t_{\text{dep}} = 20 \text{ min}$. Como en el caso del silicio monocristalino, la intensidad de fluorescencia aumenta hasta 150°C y luego vuelve a disminuir al igual que ocurría con la tasa de deposición (figura 5.20). La diferencia respecto al silicio monocristalino es que la disminución de la fluorescencia observada para 190°C , es más acusada en los sustratos de SP_n y no se aprecia la formación de las estructuras de estrías y laberintos.

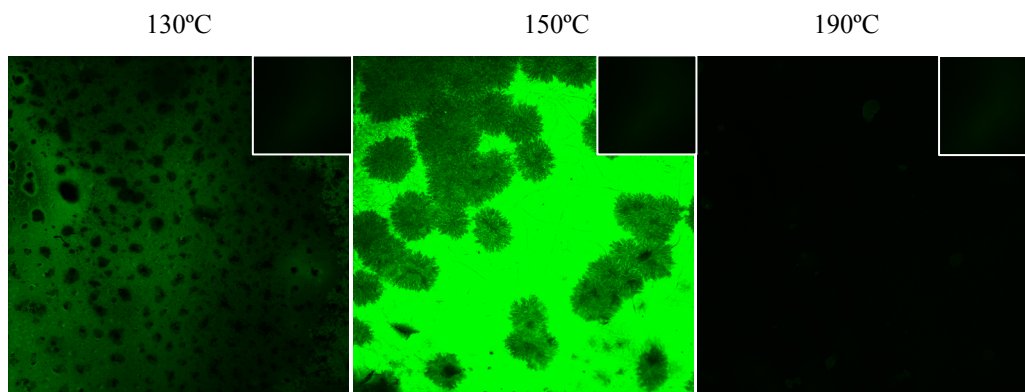


Figura 5.47: Imágenes de confocal correspondientes a sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD con distintas temperaturas de evaporación.

Las imágenes de fluorescencia correspondientes a sustratos de SP_n funcionalizados con diferentes valores de la **presión de argón** (P_{Ar}) (figura 5.48) muestran que la fluorescencia es más intensa y está distribuida con mayor uniformidad en el caso de $P_{\text{Ar}} = 0.4 \text{ mbar}$ y que es casi inexistente en el caso $P_{\text{Ar}} = 4 \text{ mbar}$. El hecho de que sobre silicio nanoestructuado la fluorescencia más intensa se recoja para $P_{\text{Ar}} = 0.4 \text{ mbar}$, en lugar de para $P_{\text{Ar}} = 1 \text{ mbar}$, se explica debido a que las condiciones de

referencia son los valores óptimos de los parámetros de funcionalización para los sustratos de silicio monocristalino, pero no para los de SP_n .

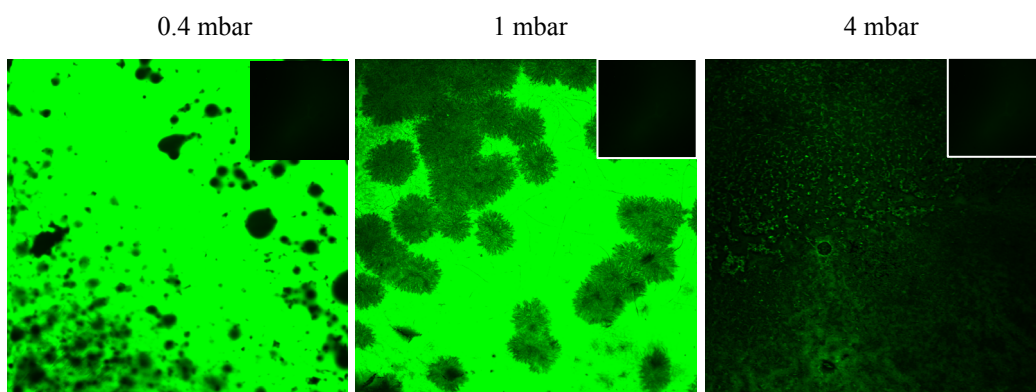


Figura 5.48: Imágenes de confocal correspondientes a sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD con distintas P_{Ar} .

Los valores de la intensidad de fluorescencia resultantes de la cuantificación se muestran en la figura 5.49, ordenados de mayor a menor:

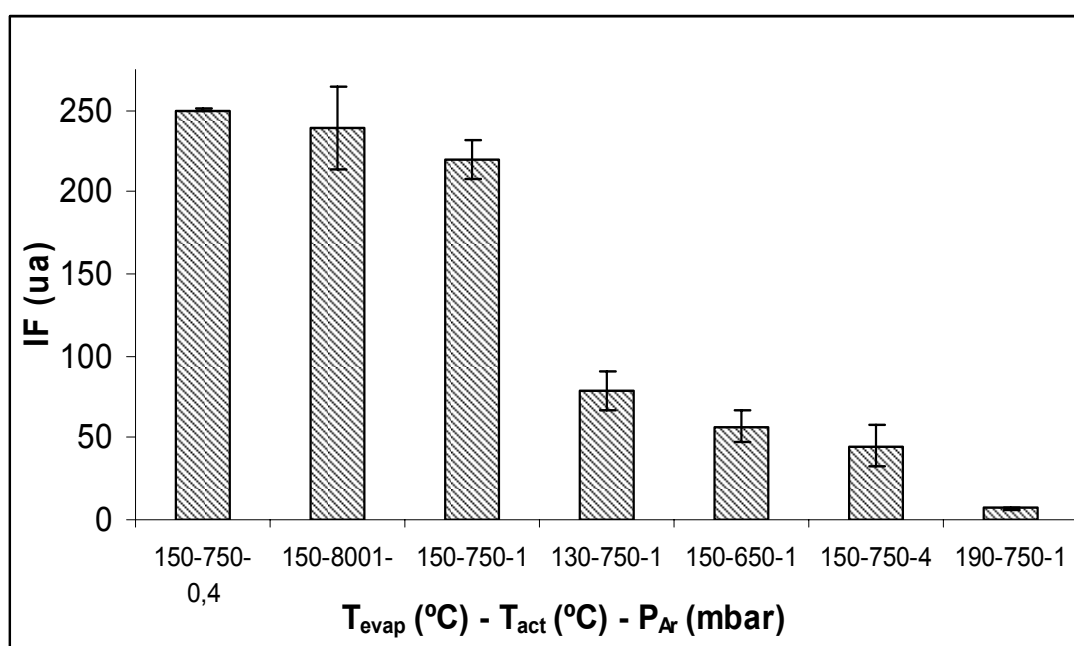


Figura 5.49: Intensidad de fluorescencia de los sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados en las condiciones estudiadas, ordenados de mayor a menor IF.

Los parámetros de funcionalización que dan lugar a la máxima intensidad de fluorescencia corresponden con una presión de argón de 0.4 mbar, es decir, los parámetros óptimos para SP_n en el rango estudiado son: $T_{evap} = 150$ °C, $T_{act} = 750$ °C y $P_{Ar} = 0.4$ mbar. Como en el caso de los sustratos de silicio monocristalino, el parámetro que da lugar a una menor variación de la intensidad de fluorescencia es la temperatura

de activación, una vez superado el valor correspondiente a la temperatura mínima de activación.

Por tanto, cabe destacar que la técnica de TACVD ofrece resultados de funcionalidad superficial muy satisfactorios en sustratos diferentes, como son el silicio monocristalino y el silicio nanoestructurado, lo que constituye el objetivo principal de la Tesis. Las diferentes propiedades de estos sustratos dan lugar a que las propiedades óptimas de funcionalización para cada uno de ellos sean distintas.

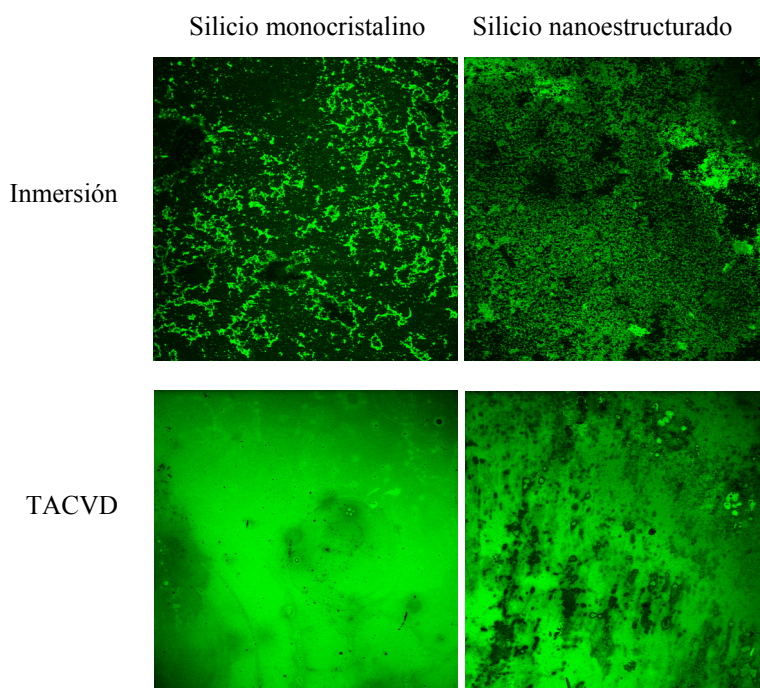


Figura 5.50: Imágenes de confocal correspondientes sustratos de silicio monocristalino y nanoestructurado funcionalizados por inmersión y por TACVD en condiciones de referencia durante 20 min.

Para terminar el estudio, se han comparado las imágenes de fluorescencia correspondientes a sustratos de silicio monocristalino y silicio nanoestructurado funcionalizados por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno y por TACVD. Para ello, se han tomado imágenes de fluorescencia de sustratos de silicio monocristalino y SP_n funcionalizados por TACVD en condiciones de referencia, empleando las mismas condiciones de medida con que se tomaron las imágenes de la figura 4.21, esto es, objetivo de 25X, $L = I = 3$, $G = 9$ y $Of = 0$ (figura 5.50). Al comparar las imágenes obtenidas por ambas técnicas de biofuncionalización, se comprueba que el proceso de TACVD da lugar a un mayor número de grupos amino reactivos y con una distribución

más uniforme sobre la superficie. Si se comparan los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos en los distintos casos, se obtiene que la intensidad asociada a los sustratos funcionalizados por TACVD es aproximadamente 2.7 veces mayor que la de los sustratos funcionalizados por inmersión, tanto en el caso del silicio monocristalino como en el del silicio nanoestructurado. Este último valor es especialmente significativo porque las condiciones de referencia no se corresponden exactamente con los parámetros óptimos de funcionalización de sustratos de silicio nanoestructurado, como se ha mostrado a lo largo del capítulo y, por lo tanto, aún queda margen para la optimización de los resultados.

5.3.4.2. Absorbancia en el ultravioleta.

El segundo de los métodos empleados para evaluar la reactividad de los grupos amino, la absorbancia en el ultravioleta, permite además realizar una estimación de la concentración de los mismos. Para ello, se emplea 4-nitrobenzaldehído, que enlaza selectivamente con los grupos amino mediante la formación de iminas, y tiene una elevada absorbancia en el ultravioleta (apartado 2.4.7).

El estudio se ha realizado empleando sustratos de *fused silica* (FS) puesto que en el apartado 4.5.2 se comprobó que los resultados obtenidos en dicho material eran comparables a los obtenidos sobre silicio monocristalino. La figura 5.51 muestra los espectros correspondientes a un sustrato de FS funcionalizado por TACVD en condiciones de referencia (línea de puntos) y funcionalizado y a continuación sometido al proceso de formación de iminas (línea continua).

A partir del valor de absorbancia en 286 nm la concentración obtenida es de $180 \text{ NH}_2/\text{nm}^2$, valor muy superior los obtenidos en los métodos de funcionalización que emplean APTS en fase vapor basados en la evaporación del APTS y la deshidratación del sustrato [26]. De hecho este valor es muy superior al de una monocapa superficial de grupos amino unidos a nitrobenzaldehído. Las hipótesis para explicar este resultado son que las películas se comporten como membranas permeables a moléculas del tamaño del nitrobenzaldehído (2.4 \AA) o que el proceso modifique las superficies de las películas biofuncionales. Para averiguarlo, se ha realizado un segundo experimento, en el que se ha calculado la concentración superficial de grupos amino correspondiente a sustratos de FS funcionalizados durante tiempos comprendidos entre 10 y 30 minutos. De forma paralela, se ha calculado la concentración empleando fluoresceína, que tiene

un tamaño de 10 Å, superior al nitrobenzaldehído. Para ello, la fluoresceína se ha fijado sobre sustratos de FS recién funcionalizados, de la misma manera que en el caso del nitrobenzaldehído, pero además sobre sustratos que previamente habían sido sometidos al proceso de formación de iminas y la subsiguiente hidrolización (apartado 2.4.7). El cálculo de la concentración de grupos amino con FITC se ha realizado a partir del valor de absorbancia en 494 nm (figura 5.52), por conocerse de forma precisa la absorptividad molar correspondiente, $76500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

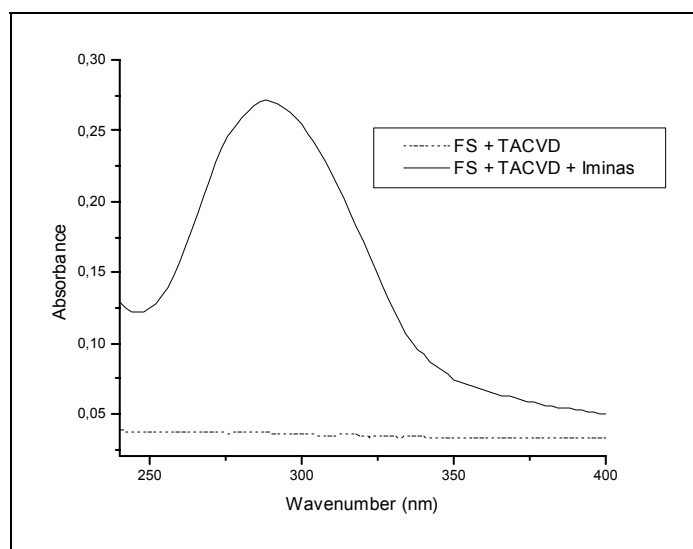


Figura 5.51: Espectros correspondientes a la muestra de FS funcionalizada (espectro punteado) y de la muestra de FS funcionalizada y sometida al proceso de formación de iminas (línea continua).

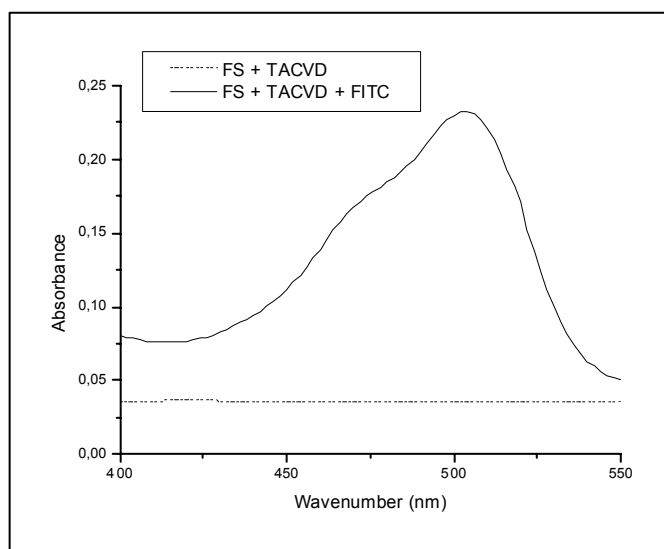


Figura 5.52: Espectros correspondientes a la muestra de FS funcionalizada (espectro punteado) y de la muestra de FS funcionalizada e incucada con FITC (línea continua).

La concentración de grupos amino obtenida empleando nitrobenzaldehído y FITC se muestra en la tabla 5.23. Los valores obtenidos a partir del 4-nitrobenzaldehído son muy elevados, aún en el caso de las muestras funcionalizadas durante 10 minutos, en las que las capas no recubren completamente la superficie, como se observó en las imágenes obtenidas por SEM (figura 5.17). Los valores obtenidos empleando FITC son diferentes según se hayan empleado muestras directamente funcionalizadas o muestras funcionalizadas y sometidas al proceso de formación de iminas e hidrólisis. En el primer caso, es decir, sustratos de FS empleados directamente tras funcionalizar, la concentración de grupos amino obtenida aumenta con el tiempo, hasta 20 minutos, tiempo para el cual la superficie está completamente recubierta. Para tiempos superiores, los valores obtenidos se mantienen prácticamente constantes. Estos resultados en relación a los obtenidos con nitrobenzaldehído indican que las películas obtenidas por TACVD se comportan como membranas permeables a moléculas de tamaño inferior a la fluoresceína, como es el caso del nitrobenzaldehído. Por otra parte, las diferencias encontradas al emplear fluoresceína en los dos tipos de muestras consideradas indican que el proceso de hidrólisis podría degradar las capas funcionales. Para comprobarlo, se ha estudiado la morfología de las muestras funcionalizadas y sometidas a dicho proceso, durante cada uno de los pasos, mediante SEM y AFM.

tiempo (min)	Nitro	FITC	
		tras hidólisis	directamente
10	120	14	4
20	180	14	8
30	233	23	7

Tabla 5.23: Grupos amino / nm², obtenidos empleando distintos reactivos.

La figura 5.53 muestra imágenes de SEM en superficie, correspondiente a sustratos de silicio monocristalino funcionalizados por TA-CVD. En las imágenes de superficie (figura 5.53, imágenes superiores), se observa que el proceso de formación de iminas modifica poco la superficie, aunque en áreas puntuales la parte exterior de las capas se levanta, mientras que la morfología cambia significativamente tras el proceso de hidrólisis, encontrándose mayor cantidad de zonas levantadas, y en consecuencia, una superficie mucho más rugosa. En las imágenes en sección transversal (figura 5.53, imágenes inferiores), se observa que las capas biofuncionales son planas y “compactas”, incluso después del proceso de formación de iminas. Sin embargo, tras realizar la

hidrólisis, la zona más superficial de las capas muestra una estructura más rugosa y abombada.

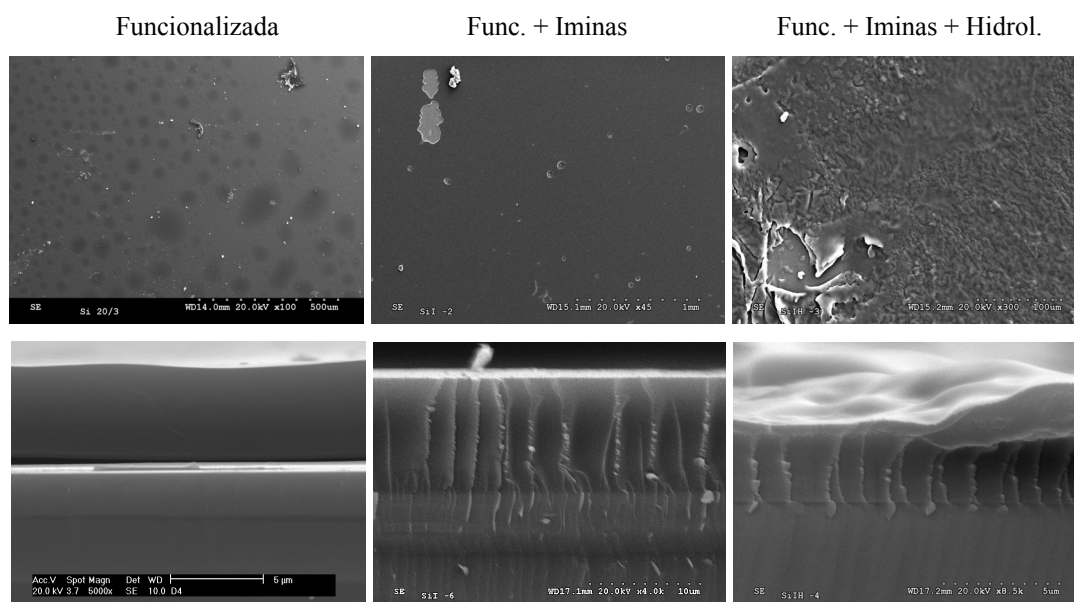


Figura 5.53: Imágenes en superficie (arriba) y sección transversal (abajo) de sustratos de Si funcionalizados por TA-CVD, izda: inmediatamente después de funcionalizar, centro: tras formar las iminas, dcha: tras hidrolizar.

El análisis de la rugosidad RMS realizado a partir de las imágenes de AFM obtenidas en cada uno de los pasos del proceso muestra los siguientes valores: $1.17 \text{ nm} \pm 0.08 \text{ nm}$, para los sustratos funcionalizados (figura 5.8), $1.2 \text{ nm} \pm 0.1 \text{ nm}$ para los sustratos funcionalizados y sometidos a continuación al proceso de formación de iminas y $0.7 \text{ nm} \pm 0.2 \text{ nm}$ para los sustratos funcionalizados, sometidos a la formación de iminas e hidrolizados. Se aprecia, por tanto, que el proceso de formación de iminas no modifica la rugosidad superficial y el proceso de hidrólisis reduce incluso su valor. Sin embargo, la estructura que presenta la superficie, sí varía a lo largo del proceso, de manera que mientras las capas funcionales muestran una estructura de gránulos diferenciados a lo largo de la superficie, como se vio en la figura 5.8, dicha estructura no se observa una vez realizado el proceso de formación de iminas (figura 5.54). El proceso de hidrólisis vuelve a cambiar la morfología, observándose sobre la superficie la creación de poros (figura 5.55).

A la vista de estos resultados, se puede concluir que las películas biofuncionales tienen una elevada concentración superficial de grupos amino, que actúan como membranas permeables para moléculas de tamaño inferior a los 10 \AA , como es el caso del nitrobenzaldehído, y que el proceso de formación de iminas y, especialmente el de

hidrólisis, modifican significativamente la superficie de las capas obtenidas por TACVD.

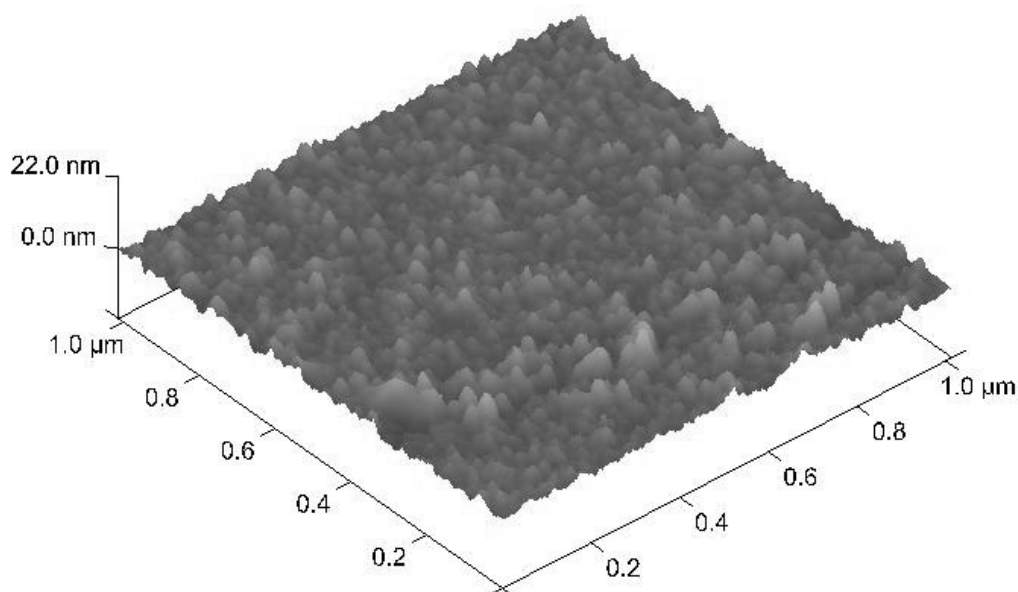


Figura 5.54: Muestra de silicio monocristalino funcionalizada por TACVD, sometida al proceso de formación de iminas.

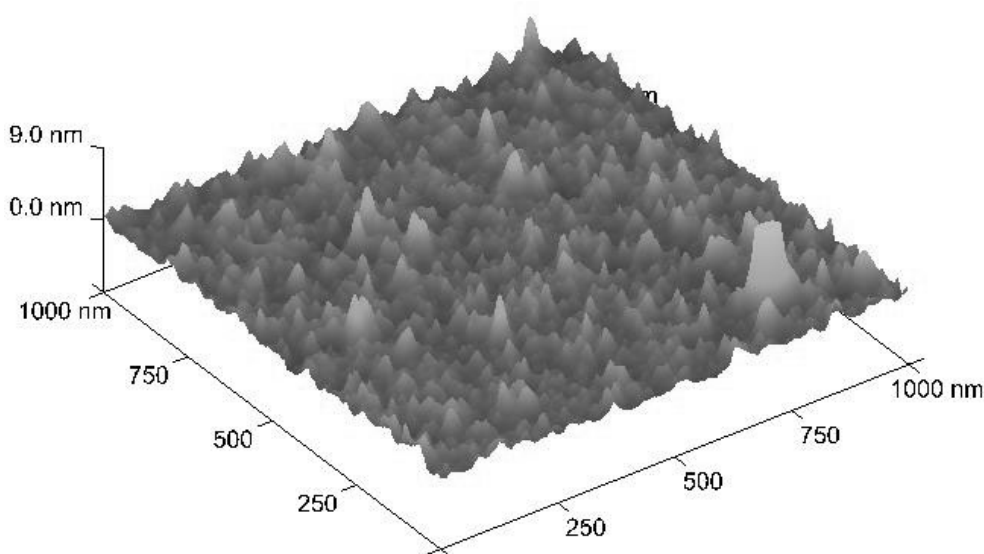


Figura 5.55: Muestra de silicio monocristalino funcionalizada por TACVD, sometida al proceso de formación de iminas y su posterior hidrólisis.

Relacionando los valores de concentración de grupos amino obtenidos para una muestra de silicio monocristalino funcionalizada en condiciones de referencia y los valores de intensidad de fluorescencia en función de los distintos parámetros de funcionalización, se puede estimar cuál es la concentración de grupos amino en los

distintos casos. Los valores obtenidos de dicha estimación se muestran en la figura 5.56, ordenados de mayor a menor concentración.

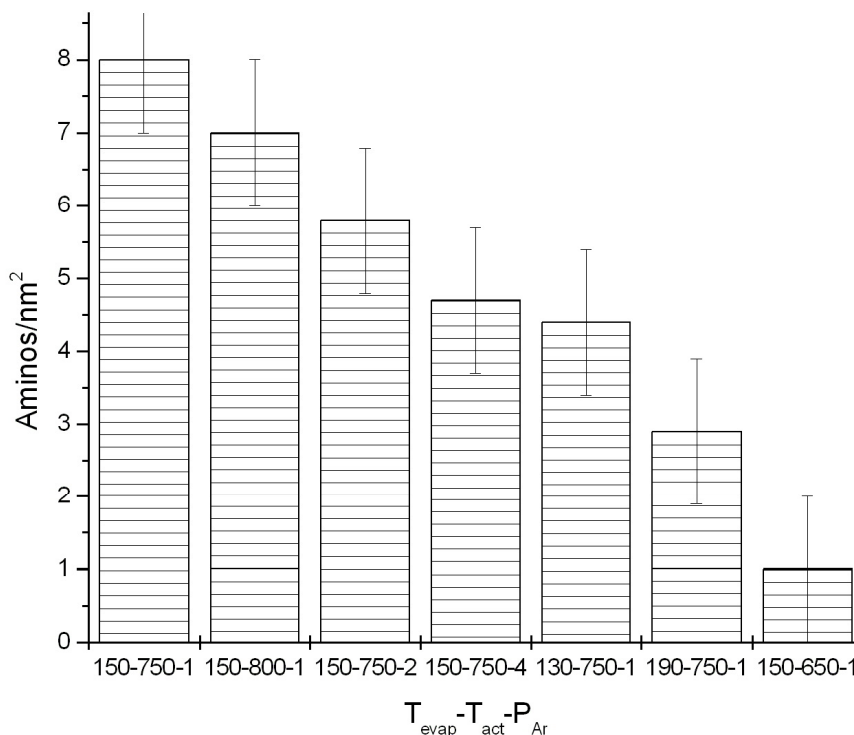


Figura 5.56: Concentración de grupos amino de los sustratos de silicio monocristalino funcionalizados en las distintas condiciones.

5.3.5. Influencia de los sustratos:

El objetivo principal de esta Tesis es el desarrollo de una técnica de biofuncionalización que dé como resultado capas biofuncionales sobre diversos sustratos, con independencia del estado químico superficial de los mismos. A lo largo de este capítulo, se ha demostrado que el TACVD ofrece muy buenos resultados tanto sobre sustratos de silicio monocristalino como de silicio poroso, con distintos tamaños de poro (SP_n y SP_M). En las películas resultantes sobre ambos sustratos, se han encontrado ciertas diferencias relacionadas especialmente con la necesidad de optimizar los parámetros de deposición en función del sustrato, aunque en todos los casos se han encontrado unas condiciones óptimas dentro del rango estudiado.

Para terminar de verificar este objetivo se han estudiado las propiedades de las películas sobre sustratos de oro, especialmente respecto a la funcionalidad. El oro se ha escogido por ser un metal noble, que presenta propiedades completamente distintas al silicio monocristalino y al silicio poroso, además de ser un sustrato ampliamente estudiado en técnicas de funcionalización, en particular en la formación de monocapas autoensambladas (SAM's). En la figura 5.57 se muestran las imágenes de SEM y de microscopía confocal correspondientes a los sustratos anteriores funcionalizados en condiciones de referencia, tomadas con los siguientes parámetros de medida: $L = I = 3$, $G = 0.3$ y $Of = 0.2$, obteniendo imágenes con un área de $305 \times 305 \mu\text{m}^2$. Las imágenes insertadas en el ángulo superior derecho corresponden con los sustratos sin funcionalizar e incubados con FITC. En todos los casos, se depositan películas uniformes sobre la superficie, como muestran las imágenes de SEM, y que además presentan una elevada funcionalidad, como muestra la fluorescencia obtenida en todos los casos, al comparar con el control correspondiente. Es interesante destacar, que si bien las condiciones empleadas muestran una fluorescencia óptima en el caso del silicio monocristalino, para el resto de sustratos es necesario optimizar dichas condiciones. En cualquier caso, queda demostrado que el método de TACVD permite biofuncionalizar sustratos con propiedades químicas diversas.

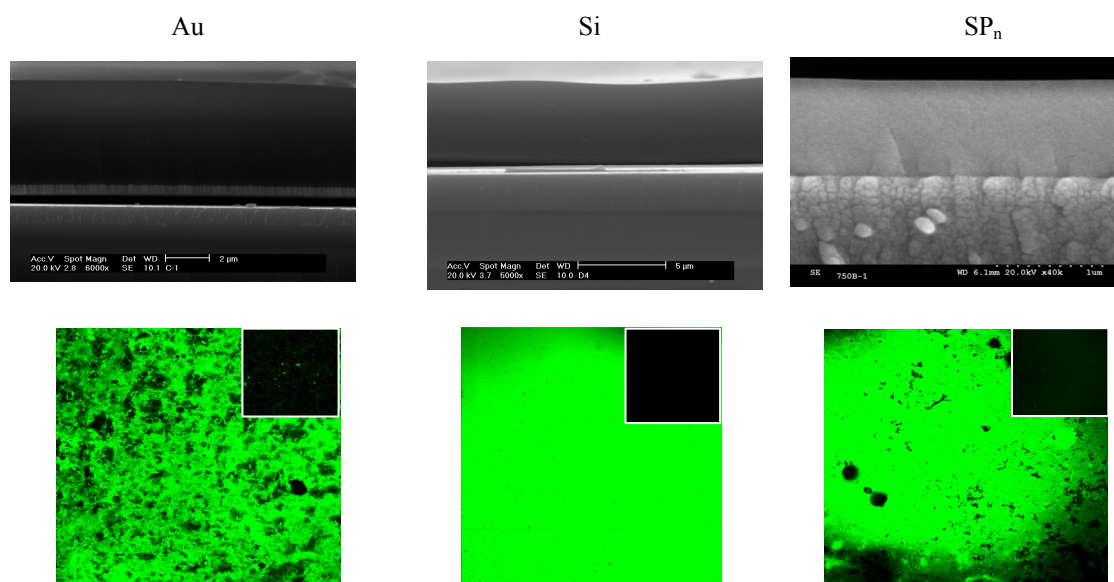


Figura 5.57: Imágenes de SEM y confocal de sustratos de oro, silicio monocristalino y silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD en CR durante 20 minutos.

5.4. Sumario.

A lo largo de este capítulo se ha estudiado la funcionalización mediante técnicas de deposición química en fase vapor, activando el APTS mediante plasma y térmicamente.

Mediante el proceso de PECVD se han depositado películas orgánicas con una elevada concentración de N en superficie. El transporte del APTS desde la cámara de reserva del precursor hasta el reactor se ha realizado a partir de la evaporación a temperatura ambiente mediante una red capilar y un flujo de argón como gas de transporte. El proceso de activación por plasma da lugar a la descomposición del APTS y a la formación de oligómeros de menor longitud que los formados por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno. Las propiedades de las películas varían de forma significativa de unas condiciones a otras, especialmente respecto a la funcionalidad de los grupos amino presentes. El estudio de la influencia de los parámetros que rigen el proceso muestra que las películas de más bajo espesor se obtienen aplicando las condiciones de potencia más altas (100W) al flujo más bajo (25 sccm). Las películas obtenidas bajo estas condiciones tienen una gran presencia de SiO₂ y cantidad baja de grupos amino, pero situados mayoritariamente en superficie, lo que compensa su baja concentración en los análisis de reactividad. Las películas con mayor cantidad de grupos amino se obtienen aplicando potencia alta/flujo alto o bien potencia baja/flujo bajo, aunque son las primeras las que presentan una mayor reactividad superficial. El empleo de condiciones dinámicas de la potencia, conlleva un aumento de casi un orden de magnitud del espesor frente a condiciones estáticas, para un valor de flujo dado, sin introducir mejoras significativas en la cantidad de grupos amino y la reactividad superficial. Aunque las películas obtenidas mediante esta técnica son funcionales, en los ensayos de interacción con sistemas biológicos presentan bajas propiedades de adherencia al sustrato.

La técnica de biofuncionalización mediante TACVD da lugar a la formación de películas con una elevada funcionalidad sobre sustratos de silicio monocristalino, nanoestructurado, macroporoso y oro, con lo que se verifica el objetivo principal de la

Tesis de encontrar un método de funcionalización eficaz con independencia de las características químicas de la superficie de los sustratos.

El mecanismo en el que se basa la biofuncionalización de los distintos sustratos es la descomposición del precursor y el calentamiento del sustrato por efecto del flujo. La descomposición del APTS se produce por la pérdida de cadenas etoxi, dando lugar a la policondensación de las moléculas, y a través de la separación de la cadena aminopropil del átomo central de silicio, dando lugar a la formación de enlaces Si-CH₃. Estos mecanismos quedan comprobados por la complejidad de los espectros de FTIR debido a la aparición de nuevas bandas de absorción lo que da lugar una gran superposición en los mismos, en comparación con los espectros obtenidos al emplear otras técnicas, así como el valor de la relación Si/N = 0.5, obtenido por RBS y XPS.

En cuanto a las propiedades de las películas, éstas recubren completamente la superficie con un espesor uniforme a lo largo de la misma. Están compuestas por los mismos átomos que forman la molécula de APTS: Si, C, O, N y H. Aunque el N es el elemento presente en menor proporción (un 10% en los casos en los que es más abundante) es interesante destacar que se encuentra en forma de grupos amino tanto en superficie como en profundidad. Esto asegura que se mantiene la funcionalidad de las películas aunque se produzca la degradación de las capas más externas lo que representa una ventaja significativa respecto a la gran mayoría de las técnicas de funcionalización en la que se deposita una sola monocapa de grupos funcionales. Además, las propiedades de microdureza de las películas crecidas sobre silicio monocristalino presentan unas propiedades prácticamente iguales a las del sustrato, con excepción de las condiciones de deposición que dan lugar a la formación de estrías y laberintos.

El estudio de las películas preparadas con distintos parámetros de deposición permite obtener información sobre la influencia de cada uno de ellos en el proceso de funcionalización. El aumento de la temperatura de activación da lugar a un aumento de la tasa de deposición. Los análisis químicos y de reactividad muestran que existe una temperatura de activación mínima a partir de la cual las moléculas de APTS sufren una mayor descomposición, dando lugar a la formación de estructuras como los Si-CH₃ o la ruptura de las cadenas aminopropil, y a partir de la cual la funcionalidad de las películas aumenta significativamente. Esta temperatura depende del sustrato y es aproximadamente 750 °C para los sustratos de silicio y 800 °C para los de SP_n. El efecto de la temperatura de evaporación y de la presión del gas de arrastre es bastante parecido, pues ambos se relacionan con la cantidad de flujo de APTS que llega al horno de

activación y por tanto a los sustratos. La tasa de deposición aumenta al aumentar ambos parámetros hasta un determinado valor a partir del cual empieza a disminuir. Este cambio de tendencia se puede relacionar con un cambio en el régimen del flujo molecular. El aumento de la temperatura de evaporación y de la presión de argón por encima de un determinado valor da lugar a la formación de estrías y laberintos, estructuras que modifican no sólo la morfología de las películas resultantes sino también sus propiedades de microdureza y de reactividad superficial. El estudio de la influencia del tiempo de deposición lleva a proponer un mecanismo de formación de las películas tipo Volver-Weber, es decir, mediante difusión de las moléculas en la superficie y la formación de núcleos de crecimiento.

Las diferencias encontradas entre los sustratos de silicio monocristalino y silicio nanoestructurado pueden estar relacionadas principalmente con las diferentes conductividades térmicas que presentan ambos sustratos y que dan lugar a una tasa de deposición más baja y una menor descomposición del APTS para los mismos parámetros de funcionalización. Por tanto, aunque esta técnica permite obtener capas con una elevada funcionalidad sobre sustratos diversos, las condiciones óptimas de deposición deben ajustarse para cada uno de ellos.

Aparte de las ventajas destacadas hasta el momento, los análisis de reactividad superficial muestran que los sustratos funcionalizados por TACVD pueden presentar una funcionalidad casi tres veces más elevada que los funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente para el mismo sustrato.

5.5. Bibliografía.

-
1. M. Manso Silvan, M. Arroyo-Hernández, V. Torres-Costa, R.J. Martín-Palma, J.M. Martínez-Duart. *Europhysics Letters*, 76 (2006), 4, 690-695.
 2. G. García-Ayuso, R. Salvarezza, J.M. Martínez-Duart, O. Sanchez, L. Vazquez. *Surface & Coatings Technology*. 101 (1998), 1-3, 459-492.
 3. P.A.Heiney, K.Segmüller, L.Fang, C.Dulcey, R.Shashidar. *Langmuir* 16 (2000), 2651.
 4. S. Ek, E.I.Iiskola, L.Niinistö, J.Vahtinen, T.T.Pakkanen, J. Keränen, A. Auroux. *Langmuir* 19 (2003), 10601-10609.

5. R.J. Martín-Palma, M.Manso, J.Pérez-Rigueiro, J.P. García-Ruiz y J.M. Martínez-Duart. *Journal of Materials Research* 19, 8 (2004) 2415.
6. M. Arroyo-Hernández, R.J. Martín-Palma, J. Pérez-Rigueiro, J.P. García-Ruiz, J.L. García-Fierro And J.M. Martínez-Duart. *Materials Science & Engineering C*, 23 (2003), 679-701.
7. Y. Pauleau (ed). "Materials and Processes for Surface and Interface Engineering". 185-243. (1995) NATO ASI Series. Series E: Applied Sciences, vol. 290. Kluwer Academic Publishers.
8. J. Albella (ed). "Láminas delgadas y recubrimientos. Preparación, propiedades y aplicaciones". 43-71. (2003). Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
9. I. Haller. *Journal of the American Chemical Society* 100 (1978), 8050-8055.
10. P. Wilkstrom, C.F.Mandenius, P.O.Larsson. *Journal of Chromatography* 455 (1988), 105-117.
11. J. Albella (ed). "Láminas delgadas y recubrimientos. Preparación, propiedades y aplicaciones". 101-123. (2003). Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
12. G.Krausch y R. Magerle. *Advanced Materials*, 14 (2002), 21, 1579-1583.
13. P.G. De Gennes. *The Physics of Liquid Crystals*. Ed. Clarendon, Oxford, 1974.
14. G.Gomper, M.Shick. *Phase Transitions and critical phenomena*, Vol-16. Ed. Academic, New York, 1994.
15. S.C. Glotzer, E.A.Di Marzio y M.Muthukumar. *Physical Review Letters* 74 (1995) 11, 2034-2037.
16. Z.Huang, W.Hong y Z.Suo. *Physical Review E*, 70 (2004), 03060-1.
17. M.T. Rodrigo Rodríguez. "Caracterización de películas delgadas mediante la técnica de nanoindentación". Grado de licenciatura en CC. Físicas (1996).
18. W.C.Oliver, G.M.Pharr. *Journal of Materials Research* 7 (1992), 1564-
19. D.Steele, J.Yarwood. *Spectroscopy and Relaxation of Molecular Liquids*. Elsevier, Amsterdam, 1991.
20. D.G.Kurth y T. Bein. *Langmuir* 11 (1995), 3061-3067.
21. L.J. Bellamy. *Advances in Infrared Groups Frequencies*, 2nd. Edition. Chapman and Hall, London, 1980.
22. H. Okabayashi, I. Shimizu, E. Nishio, C.J. O'Connor, *Colloid and Polymer Science* 275 (1997), 744-753.

23. T. Ogasawara, A. Nara, H. Okabayashi, E. Nishio and C.J. O'Connor. *Colloid and Polymer Science* 278 (2000) 1070-1084.
24. T. R. Gengebach, R.C. Chatelier, H. J. Griesser. *Surface and Interface Analysis* 24, (1996) 611-619.
25. J.L Magalhaes, L.M. Moreira, U.P Rodrigues-Filho, Martha, J Giz, M. A. Pereira-da-Silva, R. Landers, R.C.G.Vinhas P.A.P. Nascente. *Surface and Interface Analysis* 33, (2002) 293-298
26. S.EK, E.I.Iiskola y L.Niinistö. *Langmuir* 19 (2003) 3461-3471.

Capítulo 6

Bioactividad y ensayos biológicos.

6.1. Introducción.

A lo largo de los capítulos anteriores, se ha realizado la caracterización de las principales propiedades físico-químicas de los sustratos de silicio monocristalino, nanoestructurado y macroporoso, así como de las películas biofuncionales depositadas sobre ellos mediante las distintas técnicas utilizadas a lo largo de esta Tesis. Además, se ha iniciado la evaluación de las propiedades de reactividad superficial de dichas películas biofuncionales, a partir de la interacción con moléculas orgánicas de distinto tamaño: isotiocianato de fluoresceína (9.3 Å) y nitrobenzaldehído (2.4 Å). Estos ensayos han permitido demostrar que la funcionalidad de los grupos amino depende, no sólo de la concentración, sino además de otras propiedades, como la orientación de los mismos sobre la superficie, que influyen a su vez en la accesibilidad que presentan a las distintas moléculas.

Con el fin de completar el estudio de las propiedades de interacción con sistemas biológicos, en este capítulo se ha evaluado el comportamiento de los sustratos de silicio monocristalino, nanoestructurado y macroporoso, así como de las películas biofuncionales depositadas sobre ellos, al interactuar con sistemas biológicos de diversa complejidad. Para comenzar el estudio, se ha realizado un análisis de las propiedades de bioactividad tanto de los sustratos frescos como tras ser sometidos a las distintas técnicas de biofuncionalización. A continuación, se han realizado ensayos con sistemas biológicos de nivel molecular. En particular, se ha escogido un ejemplo de cada uno de los dos grandes grupos de biomoléculas, de acuerdo a su función biológica: las proteínas y los ácidos nucleicos. El ensayo con sistemas biológicos de nivel celular ha consistido en evaluar la respuesta de células pluripotenciales humanas al crecer sobre la superficie de los distintos sustratos de silicio y silicio poroso. Por último, para el estudio del nivel de mayor complejidad, el nivel de organismo, se han escogido hongos *Aspergillus*.

6.2. Ensayos de bioactividad

Como punto de partida para el estudio de la interacción entre los sistemas biológicos y los sustratos de silicio monocristalino, nanoestructurado y macroporoso, antes y después de ser funcionalizados, se han estudiado sus propiedades de

biocompatibilidad, en particular su bioactividad. Los dos efectos más importantes que pueden tener lugar, y que interesa minimizar al poner en contacto un material con un fluido biológico, son la corrosión y el encapsulamiento por fibras de tejidos adyacentes [1, 2]. De acuerdo a estos dos efectos, los materiales se pueden clasificar en bioactivos, bioinertes y reabsorbibles. Los materiales bioactivos son aquellos que tras sufrir una pequeña corrosión favorecen el crecimiento de tejido biológico sobre su superficie, formando enlaces químicos, como ocurre por ejemplo con el Bioglass®. Los materiales bioinertes sufren una mínima corrosión y encapsulamiento fibroso por parte de los tejidos adyacentes, como ocurre por ejemplo con el titanio. Por último, los materiales reabsorbibles son aquellos que sufren una elevada degradación y disolución hasta el punto de ser eliminados por el organismo, como por ejemplo las polilactidas.

La bioactividad en general está relacionada con la capacidad de un material de inducir la precipitación sobre su superficie de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), que es la fase mineral del hueso. Uno de los métodos más empleados para realizar dicha evaluación es el desarrollado por Kokubo [3], que consiste en sumergir las muestras que se van a evaluar en una disolución que simula el plasma sanguíneo humano (*Simulated Body Fluid*, SBF). Todos los detalles sobre la realización experimental se explicaron en el apartado 2.5.1. Kokubo et al [4] demostraron que hay una excelente correlación entre los resultados de estos ensayos *in-vitro* y el comportamiento de las muestras en ensayos realizados *in-vivo*, motivo por el cual éste es uno de los métodos más empleados para establecer las propiedades de bioactividad de los materiales.

La bioactividad de las distintas muestras se ha estudiado a partir de la estructura en que precipita el fosfato cálcico mediante SEM y la composición de los precipitados formados mediante EDAX. Las muestras que se han estudiado son los tres tipos de sustratos empleados a lo largo de este trabajo: silicio monocristalino, silicio nanoestructurado (SP_n) y silicio macroporoso (SP_M), antes y después de ser funcionalizados por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno (a temperatura ambiente durante 15 minutos), por TACVD (en CE durante 20 minutos) y por PECVD ($\phi_{\text{Ar,prec}} = 40 \text{ sccm}$, $P = 100\text{W}$).

Como punto de partida se ha evaluado la presencia de precipitados de fosfato cálcico así como la morfología que presentan y que dependen de propiedades de la superficie tales como su estructura [5, 6] y su funcionalidad [7]. En todas las muestras evaluadas se han encontrado precipitados de fosfato cálcico, aunque en algunos casos

como en los sustratos de silicio monocristalino y de silicio macroporoso la cantidad es casi despreciable. En cuanto a la estructura, el fosfato cálcico precipita formando núcleos de crecimiento distribuidos aleatoriamente sobre la superficie, con excepción de los sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD, sobre los que se forma una capa que recubre completamente la superficie. En la figura 6.1 A, se muestra una imagen de SEM correspondiente a un sustrato de silicio nanoestructurado, como ejemplo de precipitación en forma de núcleos de fosfato cálcico y en la figura 6.1 B se muestra una imagen de las películas que se forman sobre los sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD.

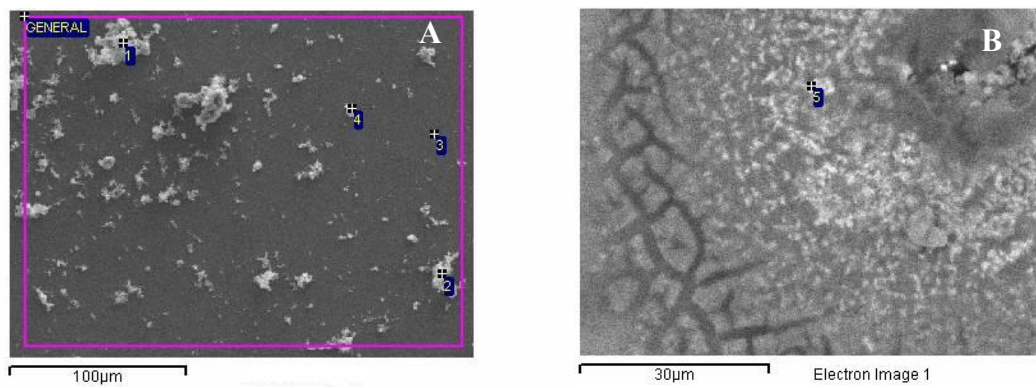


Figura 6.1: Imágenes de SEM en superficie correspondientes a silicio nanoestructurado sin funcionalizar (A) y funcionalizado por TACVD (B).

Estos resultados obtenidos, no parecen estar relacionados con la presencia o no de grupos funcionales, sino más bien con la topografía superficial de las muestras, puesto que los sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD presentaban una rugosidad RMS significativamente menor que el resto de sustratos funcionalizados y menor incluso que el propio SP_n sin funcionalizar (apartados 4.2 y 5.3.1).

A continuación se ha evaluado el porcentaje de superficie recubierta por fosfato cálcico en cada caso, ya que una mayor tasa de nucleación se relaciona con una mayor bioactividad. En la figura 6.2 se presentan los porcentajes de área recubierta por fosfato cálcico en las distintas muestras, considerando las estructuras en forma de película como un recubrimiento del 100% de la superficie. En los casos en los que no se forma película, el porcentaje de área recubierta varía desde 1 hasta 22 %. Al evaluar dichos valores de área recubierta en relación a la técnica de funcionalización empleada para cada uno de los sustratos, se observa que tanto en el caso del silicio monocristalino

como del silicio nanoestructurado, el porcentaje de superficie recubierta se ordena de mayor a menor como sigue: TACVD, Inmersión, PECVD y sustrato sin funcionalizar, es decir, que se corresponde con el orden de la concentración de grupos amino funcionales de acuerdo a los análisis realizados en los capítulos 4 y 5. El silicio monocristalino funcionalizado por TACVD presenta aproximadamente el doble de superficie recubierta que el funcionalizado por inmersión, mientras que la concentración de grupos funcionales estimados a partir de la intensidad de fluorescencia era el triple (apartado 5.3.4.1). El silicio nanoestructurado funcionalizado por TACVD presenta un porcentaje de superficie recubierta de casi cinco veces mayor que el funcionalizado por inmersión, mientras la intensidad de fluorescencia era del triple (apartado 5.3.4.1). Esto indica, que además de la concentración de grupos amino, hay otros factores que influyen en la tasa de nucleación de fosfato cálcico como la topografía y la rugosidad superficial. Ambos factores presentan bastantes diferencias entre los sustratos de silicio monocristalino y de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD (apartado 5.3.1.2). La escasa tasa de precipitación obtenida en el caso de los sustratos funcionalizados por PECVD se debe en buena medida a la baja adherencia de las películas depositadas, como se explicó en el apartado 5.2. El silicio macroporoso es el sustrato que menor bioactividad presenta, independientemente de la técnica empleada, con un porcentaje de recubrimiento superficial menor del 5% en todos los casos. Esto puede relacionarse con el bajo recubrimiento que se obtiene al emplear las distintas técnicas de biofuncionalización sobre silicio macroporoso en comparación con el recubrimiento obtenido sobre los sustratos de silicio monocristalino y nanoestructurado en las mismas condiciones de funcionalización.

El porcentaje de área recubierta en relación a los distintos sustratos funcionalizados por una misma técnica, muestra los siguientes comportamientos: el recubrimiento obtenido en los sustratos sin funcionalizar, se ordena de la misma forma que su reactividad superficial, es decir, silicio nanoestructurado seguido con bastante diferencia por silicio macroporoso y monocristalino. De esta forma se comprueba que el silicio nanoestructurado es bioactivo, como era de esperar de acuerdo a su porosidad y tamaño de poro [8]. Los sustratos funcionalizados, con independencia de la técnica empleada, se ordenan de mayor a menor porcentaje de área recubierta como sigue: silicio nanoestructurado, silicio monocristalino y, por último, silicio macroporoso. Es decir, el silicio nanoestructurado es el sustrato que da lugar a una mayor tasa de

precipitación de fosfato cálcico con independencia de que se haya funcionalizado o no y de la técnica empleada para ello.

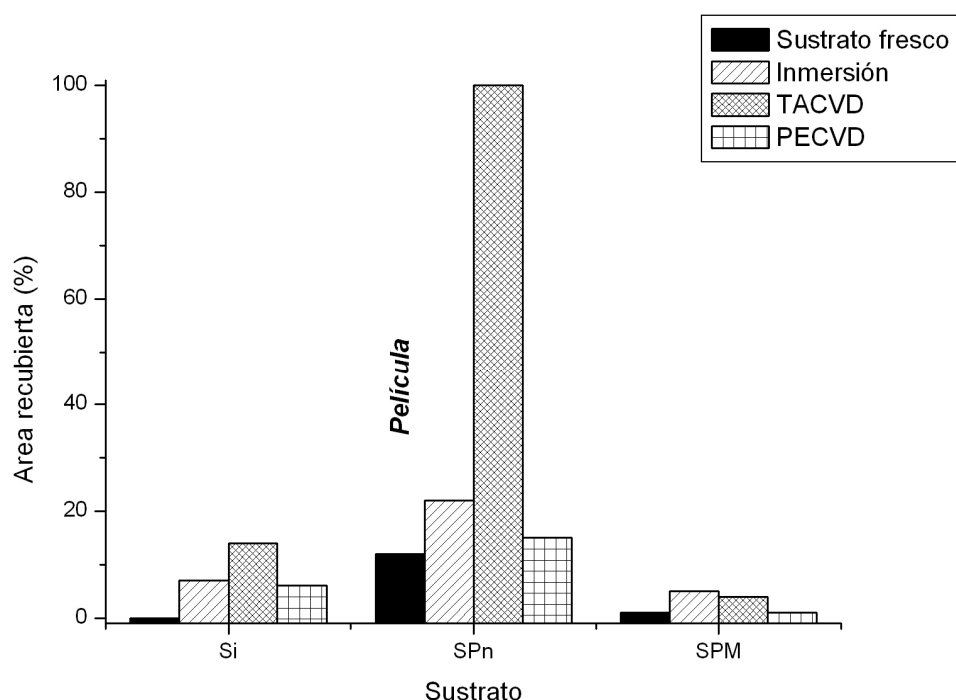


Figura 6.2: Porcentaje de superficie de los distintos sustratos recubierta por fosfato cálcico.

Fase	Ca/P	Estequiometría
Hidroxiapatita (HAp)	1.67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Fosfato dicálcico (DCP)	1.00	CaHPO_4
Fosfato dicálcico dihidratado (DCPD)	1.00	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Fosfato octacálcico (OCP)	1.33	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Fosfato β -tricálcico (β -TCP)	1.55	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Apatita defectuosa (Ca-def)	1.33 - 1.67	$\text{Ca}_{10-u}(\text{HPO}_4)_u(\text{PO}_4)_{6-u}(\text{OH})_{2-u}$; $u = 10 - 6\text{Ca/P}$
Whitlockite (Mg-TCP)	0.5 - 1.5	$\text{Ca}_{3-u}\text{Mg}_u(\text{PO}_4)_2$; $u = 3 - 2\text{Ca/P}$

Tabla 6.1: Fases de fosfato cálcico estables más comunes.

En segundo lugar, se ha caracterizado la fase de fosfato cálcico en que se producen los precipitados mayoritariamente. Para ello, se ha analizado la relación Ca/P obtenida a partir de los espectros de EDAX, así como la presencia o ausencia de otros elementos que pueden aparecer formando parte de fases estables del fosfato cálcico. En la tabla 6.1 se muestran las fases estables más comunes, junto con la relación Ca/P asociada a cada una de ellas y la estequiometría correspondiente [7, 9].

Los espectros de EDAX muestran que los elementos presentes en mayor concentración en la superficie de todos los sustratos son Ca, P, O y Si. Además, en algunos casos se han encontrado otros elementos como Mg, Na o Cl, que proceden del SBF, o F, procedente del electrolito de fabricación del silicio poroso. Estos últimos elementos se encontraron en concentraciones atómicas menores al 2%. En general se ha observado que la aparición de Mg se produce en los precipitados de fosfato cálcico formados sobre los sustratos funcionalizados. La figura 6.3 muestra espectros de EDAX correspondientes a los sustratos de silicio nanoestructurado, antes (figura 6.3, A) y después de ser funcionalizados por TACVD (figura 6.3, B), en los que se puede observar la presencia de F y de Mg, respectivamente.

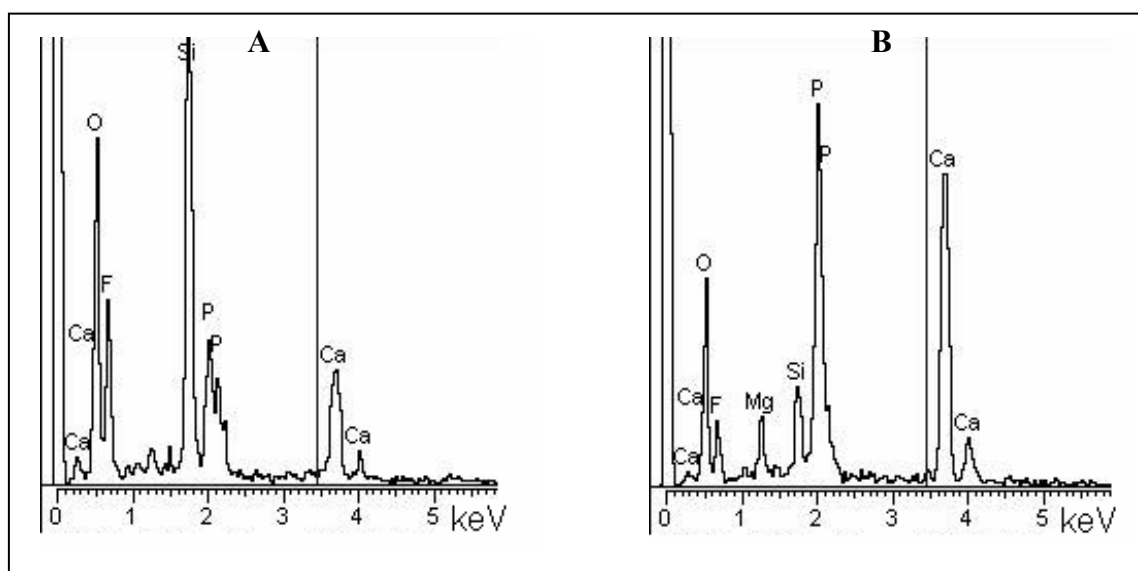


Figura 6.3: Espectros de EDAX correspondientes a sustratos de SP_n sin funcionalizar (A) y funcionalizado por TACVD (B).

A partir de los valores de los porcentajes atómicos de Ca y P obtenidos se puede calcular la relación Ca/P e identificar la fase de fosfato cálcico correspondiente. Los valores de Ca/P obtenidos muestran una elevada dispersión (entre 0.6 y 1.6), tanto dentro de un mismo sustrato como al comparar los diferentes sustratos entre sí. Aunque se ha encontrado una relación Ca/P que aparece mayoritariamente en cada sustrato (figura 6.4), a partir de estos valores no se puede establecer una correspondencia entre una fase de precipitación preferente y los distintos sustratos y técnicas de biofuncionalización. Sin embargo, mediante el cálculo de la estequiometría de la fase correspondiente a partir de dicho valor de Ca/P mayoritario y de la presencia o no de

Mg en los espectros, se observan dos tendencias de comportamiento en función de que los sustratos estén o no funcionalizados. El valor de la relación Ca/P obtenido en los sustratos de silicio nanoestructurado es 1.02, que corresponde con la fase fosfato dicálcico (DCP), y el valor obtenido sobre silicio macroporoso es 1.6, que corresponde a hidroxiapatita (HAp).

Los valores de Ca/P encontrados para los sustratos funcionalizados varían entre 0.85 y 1.27. Estos valores, junto con la presencia de Mg, permiten proponer que la fase mayoritaria es withlockite (Mg-TCP), con una estequiometría asociada $\text{Ca}_2\text{Mg}(\text{PO}_4)_2$. Tan sólo hay una excepción a este comportamiento: el silicio nanoestructurado funcionalizado por PECVD, con un valor de Ca/P de 1.39, correspondiente a Apatita-defectuosa de estequiometría $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4$. De nuevo este resultado se podría atribuir a la degradación parcial que sufren las películas obtenidas por PECVD en contacto con las disoluciones de los ensayos biológicos.

El comportamiento observado en cuanto a la fase de fosfato cálcico precipitada sobre sustratos frescos y sustratos funcionalizados se relaciona con los grupos terminales sobre cada tipo de superficie, pues los distintos grupos funcionales inducen una interacción distinta con los iones presentes en el SBF. Así, los sustratos de silicio nanoestructurado presentan una superficie con una elevada concentración de grupos OH, como resultado de la reacción de los grupos SiF_x ($x = 1, 2$) con el vapor de agua atmosférico [10], y de la tendencia a formar enlaces Si-OH al estar en disoluciones salinas (como se vio en el apartado 3.3). La presencia de grupos OH implica que la formación de fosfato cálcico se inicia a partir de la interacción bipolar iónica de éstos con los iones de Ca^{2+} . En el caso de las superficies funcionalizadas, la formación de fosfato cálcico comienza mediante la interacción iónica de los grupos NH_3^+ con los iones PO_4^- presentes en la disolución de SBF. En la bibliografía [8] se ha encontrado que la tasa de crecimiento de fosfato cálcico asociada a superficies hidroxilizadas (ricas en -OH) es mayor que la asociada a superficies que contienen grupos amino. Sin embargo en los sustratos estudiados se observa el efecto contrario, y son las superficies con grupos amino terminales las que presentan mayor área recubierta (figura 6.2). Esto puede atribuirse a que la concentración de grupos amino obtenida al funcionalizar los sustratos es considerablemente superior a la concentración de grupos OH de los sustratos sin funcionalizar.

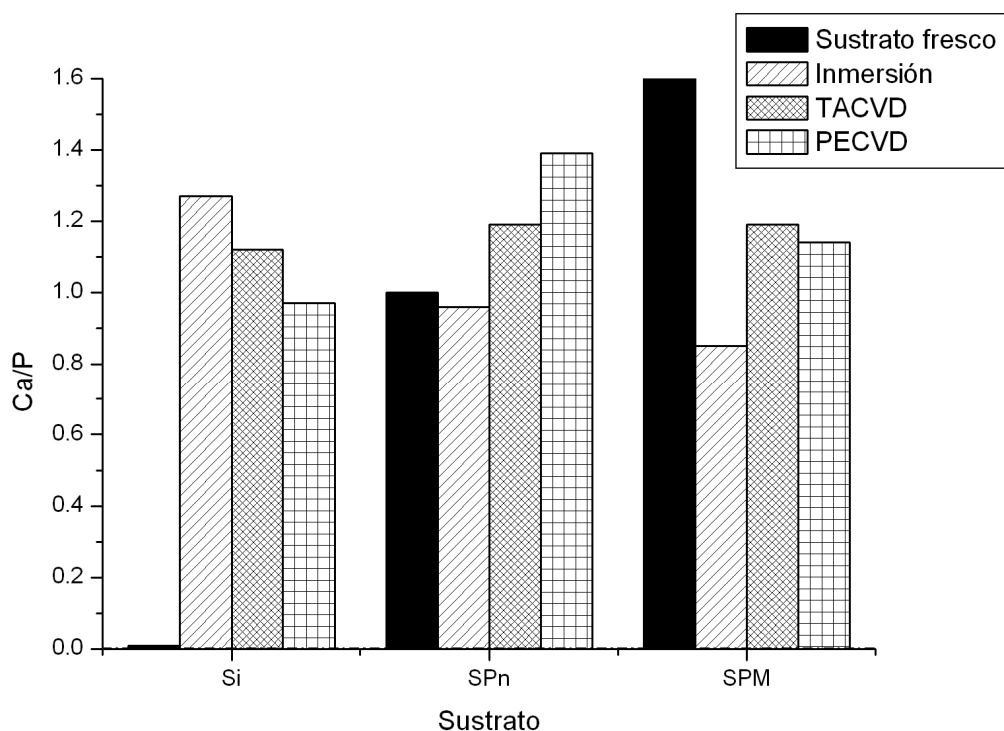


Figura 6.4: Relación Ca/P más abundante calculada a partir de los espectros EDAX.

En conclusión, se ha verificado que se produce la precipitación de fosfato cálcico en todos los sustratos a excepción del silicio monocristalino y el silicio macroporoso sin funcionalizar. El sustrato que induce una mayor precipitación es el silicio nanoestructurado, con independencia de estar recién preparado o funcionalizado por cualquiera de los métodos empleados. Entre las distintas técnicas de funcionalización, TACVD es la que da lugar a una mayor tasa de precipitación de fosfato cálcico. Por último, las distintas fases encontradas dependen de que los sustratos estén funcionalizados o no; así sobre silicio nanoestructurado la fase mayoritaria es fosfato dicálcico (DCP, CaHPO_4), sobre SP_M es hidroxiapatita (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y sobre los sustratos funcionalizados es withlockite (Mg-TCP) con estequiometría $\text{Ca}_2\text{Mg}(\text{PO}_4)_2$.

6.3. Inmovilización de proteínas.

A continuación se han evaluado las propiedades de los sustratos funcionalizados al interaccionar con proteínas. Para ello, se han empleado proteínas de ratón del grupo

de las inmunoglobulinas (Ig) cuya característica principal es la capacidad de unirse específicamente con un anticuerpo. Su unidad estructural está formada por cuatro cadenas de proteínas que tienen forma de Y, unidas entre sí por puentes disulfuro. La base de la Y determina el tipo de anticuerpo: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. En este trabajo, se han empleado proteínas Ig de ratón sin purificar, esto es, constituidas por una mezcla de todos los tipos anteriores. Se trata además de proteínas policlonales, es decir, que tienen distintos sitios de reconocimiento específico de los anticuerpos correspondientes [11].

Como se explicó en el apartado 2.5.2, las proteínas se han fijado mediante enlace covalente con los grupos amino de la superficie, empleando un agente entrecruzante (1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida hidrocloreto, EDC). Empleando anticuerpos anti-ratón, que son anticuerpos de reconocimiento específico de proteínas de ratón, marcados con fluoresceína (FITC), se puede evaluar la presencia de las proteínas inmovilizadas sobre la superficie mediante microscopía de fluorescencia. Entre las aplicaciones más destacables de dicha inmovilización puede destacar el desarrollo de biosensores y de interfases híbridas estables entre las superficies y los sistemas biológicos, por ejemplo en el caso de células, mediante la fijación de anticuerpos específicos de reconocimiento de la membrana celular.

Como punto de partida para estudiar el comportamiento de los distintos sustratos al interaccionar con proteínas, se ha verificado la presencia de éstas mediante FTIR. Para ello, se han escogido sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por inmersión en disoluciones de tolueno y APTS, en lugar de TACVD, ya que los espectros de FTIR presentan menor complejidad y solapamiento de las bandas de absorción, como se vio en los apartados 4.3.1 y 5.3.3.2. Esto permite identificar con mayor claridad las bandas de absorción correspondientes a la presencia de proteínas. La figura 6.5 muestra el espectro obtenido en el rango $850\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ para sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por inmersión durante 20 minutos a temperatura ambiente. En el espectro se observa la superposición de las bandas de absorción correspondientes al proceso de funcionalización en dicho rango (Si-O-C y CH_2) junto con las bandas asociadas a las proteínas: amida I ($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, vibración ν de C=O del enlace peptídico), amida II ($1500\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, superposición de las vibraciones δ de C-N y *bending* en el plano de N-H del enlace peptídico), y amida III

alrededor de 1250 cm^{-1} . Este último pico se superpone con el correspondiente a estructuras $\text{CH}_2\text{-S}$, características del aminoácido cisteína [12, 13].

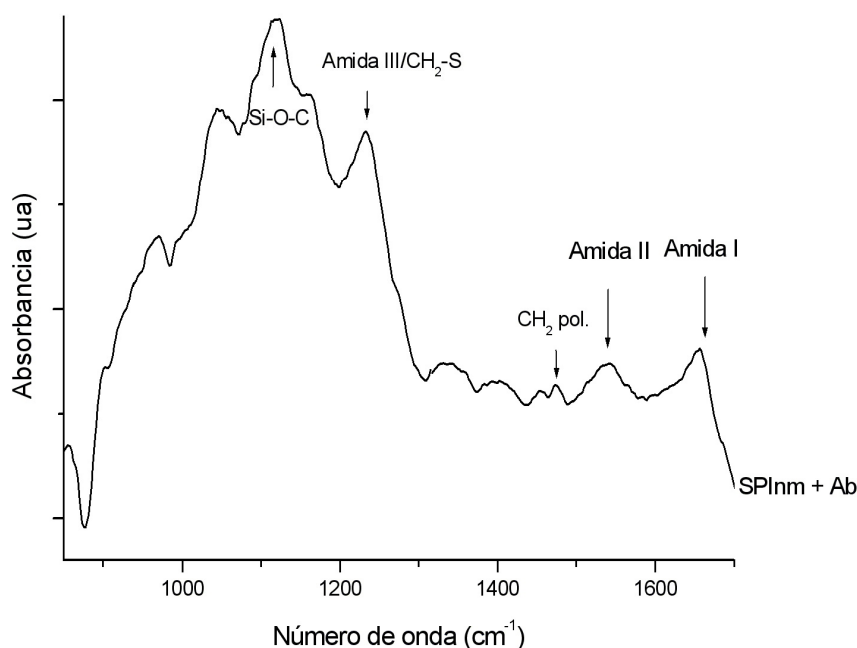


Figura 6.5: Espectro de FTIR de un sustrato de silicio nanoestructurado funcionalizado por inmersión en APTS y tolueno a temperatura ambiente durante 20 minutos sobre el que se han inmovilizado proteínas de ratón.

Una vez se ha probado la presencia de proteínas mediante FTIR, se ha procedido a realizar la detección por fluorescencia empleando sustratos funcionalizados por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno y por TACVD. La figura 6.6 muestra las imágenes obtenidas para sustratos de silicio nanoestructurado sobre los que se han fijado proteínas, antes (A) y después (B) de ser funcionalizados por inmersión a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las imágenes se han realizado con el microscopio de fluorescencia empleando las siguientes condiciones de medida: objetivo 20X, rango de verde: 0-255 y tiempo de exposición: 1 s, obteniendo imágenes con dimensiones de $340 \times 429\text{ }\mu\text{m}^2$. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia (IF) muestra que los sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados (figura 6.6, B) tienen una intensidad de fluorescencia de unas 1.5 veces superior a la de los sustratos de silicio nanoestructurado sin funcionalizar (figura 6.6, A). Además, si se compara la distribución que presenta la fluorescencia procedente de la detección de las proteínas con la obtenida para los sustratos de silicio nanoestructurado, funcionalizados e

incubados con isotiocianato de fluoresceína, FITC (apartado 4.5.1), se observa que las proteínas no reproducen las estructuras coloidales y que se produce una disminución de la eficiencia. Esto puede explicarse porque las proteínas tienen un tamaño muy superior a la fluoresceína, lo que hace que el número de grupos amino funcionales para reaccionar con ellos, es decir, los grupos amino que son accesibles a las proteínas, se vea reducido significativamente.

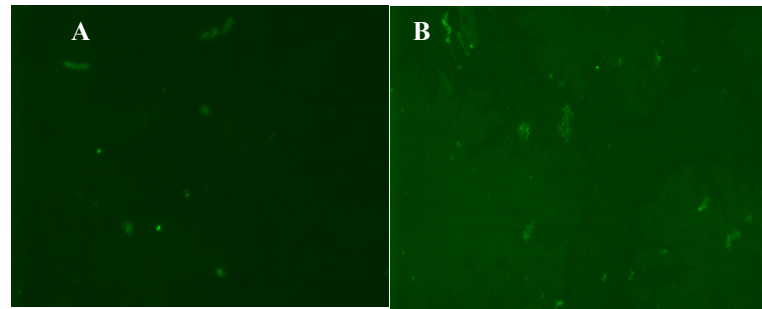


Figura 6.6: Imágenes de fluorescencia de sustratos de silicio nanoestructurado tras ser incubados con proteínas, antes (A) y después de ser funcionalizado por inmersión (B).

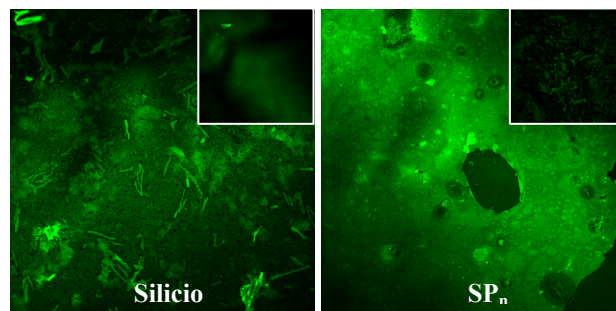


Figura 6.7: Imágenes de confocal correspondientes a sustratos de silicio monocristalino y nanoestructurado tras ser incubados con proteínas. Las imágenes insertadas en el ángulo superior derecho corresponden con los sustratos sin funcionalizar.

A continuación se ha evaluado la fluorescencia que presentan los sustratos de silicio monocristalino y silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD en condiciones estándar durante 20 minutos (figura 6.7). En este caso las imágenes se tomaron con el microscopio confocal con las siguientes condiciones de medida: 25X, $L = I = 3$, $G = 7$, $Of = -1.7$. Las imágenes insertadas en el ángulo superior derecho corresponden a los controles, es decir, a los sustratos respectivos sin funcionalizar sobre los que se han fijado proteínas. Todas ellas tienen una superficie de $459 \times 459 \mu\text{m}^2$. En la figura 6.7 se observa que la fluorescencia procedente de la detección de proteínas se distribuye con menor uniformidad que la fluorescencia obtenida en los sustratos

funcionalizados por TACVD e incubados con FITC (apartado 5.3.4.1). A partir de la cuantificación de la fluorescencia, se obtiene que ésta es 1.7 veces mayor en los sustratos funcionalizados que en los sustratos controles para sustratos de silicio monocristalino y es 3.8 veces mayor en el caso del silicio nanoestructurado. Los valores correspondientes para la intensidad de fluorescencia obtenida en los sustratos funcionalizados e incubados con fluoresceína directamente son: 12.5 veces superior para los sustratos de silicio monocristalino y 19.23 para los sustratos de silicio nanoestructurado. Estos resultados ponen de manifiesto la disminución del porcentaje de grupos amino funcionales para la interacción con proteínas frente al porcentaje funcional para la interacción con fluoresceína, debido a la diferencia de tamaño que presentan las dos moléculas de estudio. No obstante, es interesante destacar que los valores son superiores a los obtenidos en los sustratos funcionalizados por inmersión de APTS y tolueno, especialmente en el caso del silicio nanoestructurado, lo que demuestra una vez más que la funcionalización por TACVD da lugar a superficies con una elevada funcionalidad, mayor que la obtenida por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno.

Por tanto, a partir de las imágenes de fluorescencia se verifica que se han fijado proteínas sobre los distintos sustratos funcionalizados tanto por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno como por TACVD y que las proteínas mantienen su funcionalidad al ser detectadas mediante los anticuerpos correspondientes. Al comparar los sustratos funcionalizados por TACVD respecto a su correspondiente control sin funcionalizar, se observa que el silicio nanoestructurado presenta una mayor fluorescencia que el silicio monocristalino pese a que la concentración de grupos funcionales es ligeramente inferior a la obtenida sobre este último (figura 5.49). Las diferencias podrían explicarse en términos de la morfología que presentan las capas resultantes sobre ambos sustratos. Así, en el apartado 5.3.1.1 se vio que sobre silicio monocristalino se forman estructuras de grano que dan lugar a una rugosidad RMS superior a la obtenida sobre silicio nanoestructurado. Esta diferencia de rugosidad, influye en la accesibilidad de los grupos funcionales a las diversas biomoléculas con las que van a interactuar, de forma que para la FITC y el nitrobenzaldehído, que son moléculas orgánicas con un tamaño inferior a 10 Å, la mayor parte de los grupos aminos son accesibles y, sin embargo, para moléculas del tamaño de las proteínas lo son en menor porcentaje. Por otro lado, si se compara la fluorescencia de los sustratos

funcionalizados por cada una de las técnicas, en relación a la de los sustratos respectivos sin funcionalizar, se observa que la técnica de TACVD da lugar a una mayor intensidad de fluorescencia como corresponde al hecho de que haya una mayor concentración de grupos funcionales.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, una de las aplicaciones más importantes de la fijación de proteínas sobre las superficies es el desarrollo de biosensores. Para desarrollar un biosensor es necesario determinar alguna propiedad cuya variación permita detectar la molécula problema. Los biosensores de silicio poroso se basan en las variaciones de sus propiedades ópticas para detectar biomoléculas. De entre estas propiedades, la fotoluminiscencia tiene como desventaja su inestabilidad en el tiempo (capítulo 3) por lo que de forma más habitual se emplean otras propiedades como la reflectancia.

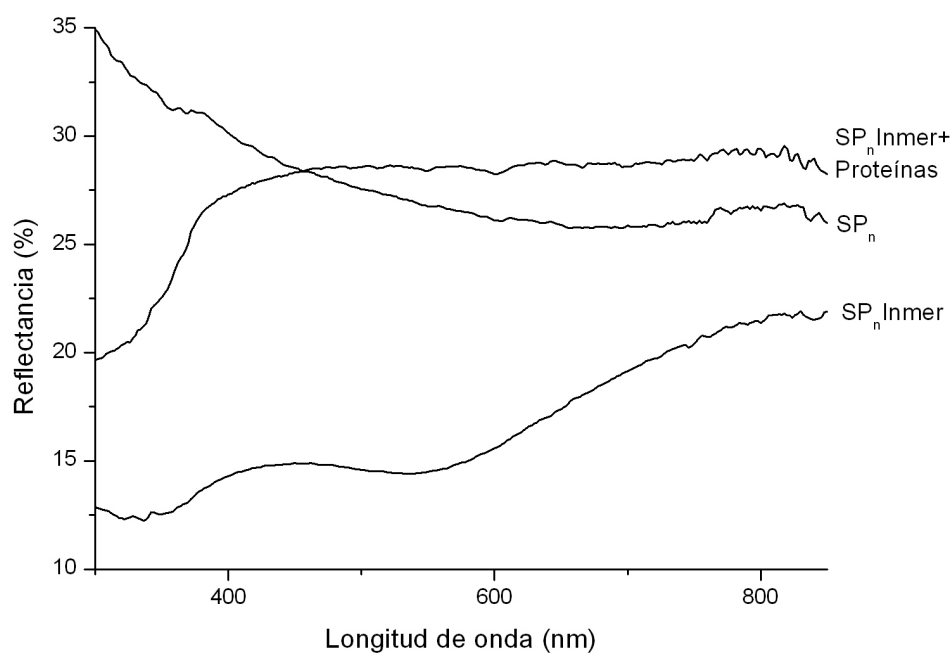


Figura 6.8: Espectro de reflectancia de sustratos de silicio nanoestructurado recién hecho, funcionalizado por inmersión y funcionalizado por inmersión e incubado con proteínas.

Como una primera aproximación al futuro desarrollo de un biosensor, se ha evaluado la variación de la reflectancia en el rango visible, en concreto para longitudes de onda entre 300 y 850 nm, en los distintos pasos del proceso, es decir, silicio nanoestructurado recién formado, silicio nanoestructurado funcionalizado y silicio nanoestructurado, funcionalizado y sometido al proceso de inmovilización de proteínas.

La figura 6.8 muestra los espectros de reflectancia correspondientes a sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por inmersión en disoluciones APTS y tolueno. Al comparar los distintos espectros se observa que la reflectancia disminuye tras el proceso de funcionalización respecto a la del sustrato recién formado, especialmente por debajo de 650 nm. Una vez se han fijado las proteínas, la reflectancia aumenta significativamente, es decir, se obtiene una variación significativa en los espectros antes y después de fijar proteínas sobre la superficie.

El mismo estudio se ha repetido sobre sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados por TACVD, obteniendo los siguientes espectros (figura 6.9). De nuevo, se observa un cambio significativo entre los espectros de los sustratos funcionalizados antes y después de inmovilizar las proteínas sobre las superficies.

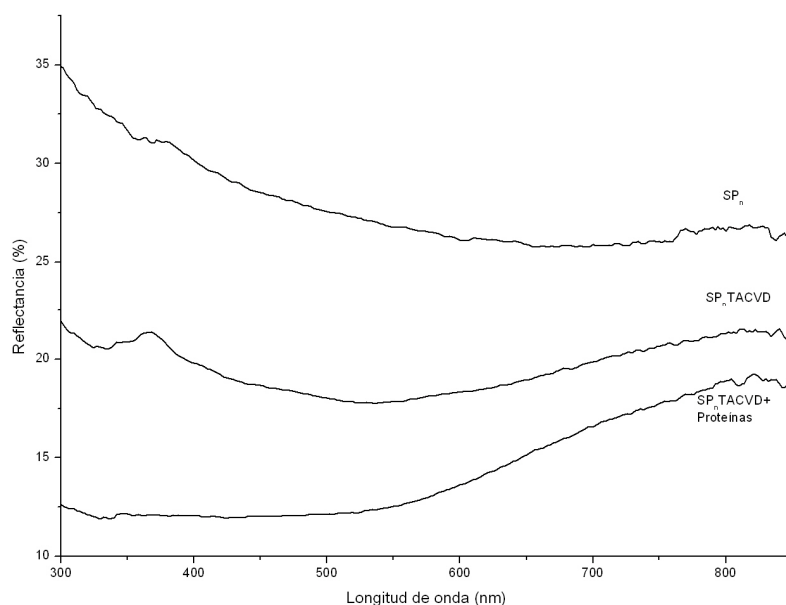


Figura 6.9: Espectro de reflectancia de sustratos de silicio nanoestructurado recién formado, funcionalizado por TACVD y funcionalizado por TACVD e incubado con proteínas.

Todo lo anterior muestra que la reflectancia del silicio nanoestructurado en el rango visible varía significativamente en función de la presencia o no de proteínas inmovilizadas sobre la superficie.

No obstante, para desarrollar un biosensor, es necesario poder relacionar de forma precisa las variaciones producidas en los espectros de reflectancia con la fijación de proteínas. Teniendo en cuenta todo lo anterior, se ha realizado un nuevo estudio en el que se emplean como sustratos multicapas de silicio nanoestructurado. Dichas

multicapas constan de capas alternas de SP_n de bajo y alto índice de refracción que se comportan como reflectores de Bragg. Combinando los valores adecuados de espesor y de porosidad de dichas capas, se puede ajustar la posición y la anchura del máximo de reflectancia [14]. Para este estudio se ha escogido la funcionalización por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno porque las estructuras funcionales, formadas por agregados de coloides (apartado 4.2) no modifican la estructura multicapa y, por lo tanto, tampoco el espectro de reflectancia. La figura 6.10 muestra los espectros de reflectancia obtenidos en los distintos pasos: multicapa de SP_n tras dejar oxidar para estabilizar el espectro de reflectancia (espectro negro), tras funcionalizar por inmersión (espectro azul) y tras funcionalizar e incubar con proteínas (espectro azul). El proceso de funcionalización induce un determinado desplazamiento del máximo (35 nm) como consecuencia de la oxidación sufrida por los sustratos de silicio nanoestructurado en el proceso de funcionalización (apartado 4.3). El desplazamiento obtenido en la posición del máximo, para las concentraciones de proteínas indicadas en el apartado 2.5.2, es de 16 nm respecto al espectro de la multicapa funcionalizada y de 19 nm respecto a la multicapa envejecida.

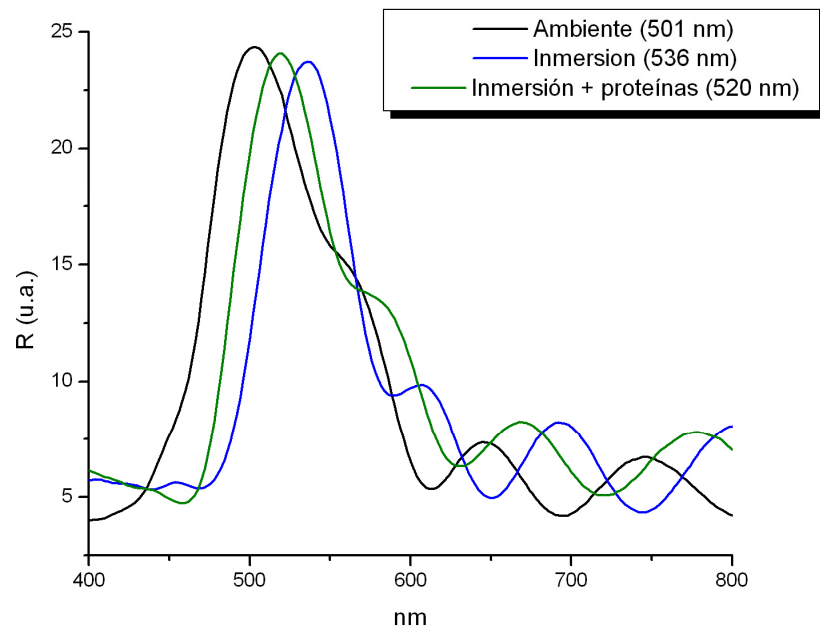


Figura 6.10: Espectros de reflectancia de multicapas de SP_n (negro), SP_n funcionalizado por inmersión azul) y SP_n funcionalizado por inmersión e incubado con Ab (verde).

En resumen, queda comprobada la inmovilización de proteínas sobre la superficie de los sustratos funcionalizados y que dichas proteínas mantienen su estructura funcional al ser reconocidas por su anticuerpo correspondiente. Las pruebas realizadas para evaluar las variaciones de los espectros de reflectancia del silicio poroso en el rango visible muestran cambios significativos en los espectros una vez fijados las proteínas. Empleando multicapas de silicio nanoestructurado, estos cambios se traducen en desplazamientos del máximo de reflectancia que pueden relacionarse con las proteínas inmovilizadas.

6.4. Inmovilización de ADN.

El siguiente ensayo biológico, realizado con sistemas de orden molecular, consistió en la inmovilización de ácido Desoxirribonucleico (ADN) sobre la superficie de los materiales. El ADN contiene la información genética de los seres vivos y se encuentra en el núcleo celular, con excepciones como el caso de las bacterias, en las que se encuentra en el citoplasma.



Figura 6.11: Esquema de la estructura tridimensional del ADN.

El ADN está constituido por dos largas cadenas de nucleótidos, unidas entre sí, formando una estructura tridimensional, la doble hélice (figura 6.11). Cada nucleótido está formado por un grupo fosfato, una desoxirribosa y una base nitrogenada. Las bases nitrogenadas son 4: adenina, guanina, citosina y timina. Las dos cadenas de nucleótidos se unen entre sí mediante puentes de H, de la siguiente manera: adenina y timina se

unen mediante dos puentes de hidrógeno y citosina y guanina se unen mediante tres. De modo que las dos hebras que componen la molécula de ADN se relacionan específicamente por lo que se denominan complementarias y el proceso de unión de las dos cadenas complementarias se llama hibridación.

En los últimos años, la fijación de ADN sobre superficies ha sido objeto de estudio, especialmente en el desarrollo de biosensores. Los biosensores de ADN se basan en la inmovilización por enlace covalente de una de las hebras de la cadena de ADN al sustrato, “ADN problema”. Esta hebra hibrida con su cadena complementaria de forma específica. Por lo tanto, a partir de la inmovilización de cadenas de nucleótidos adecuadas, se puede detectar un fragmento concreto de ADN [15, 16]. La inmovilización de la primera hebra por enlace covalente y la detección de la segunda mediante hibridación aseguran uno de los requisitos más importantes de un biosensor, la reutilización.

Los detalles del ADN empleado y el proceso para llevar a cabo la fijación e hibridación se explican en el apartado 2.5.3. Es interesante destacar que aunque la detección de ADN se realiza habitualmente por radiactividad, en este trabajo se ha realizado por fluorescencia. La ventaja que presenta la radiactividad es que tiene un límite de detección inferior a la fluorescencia, sin embargo presenta desventajas importantes asociadas a los problemas de seguridad en su manejo y de elevada contaminación. Como las cantidades de ADN fijadas en este estudio son claramente detectables por marcadores fluorescentes, se ha preferido el uso de los mismos.

Como punto de partida, se ha estudiado el comportamiento de sustratos de silicio nanoestructurado y macroporoso, antes y después de ser biofuncionalizados por las distintas técnicas estudiadas. El estudio se ha realizado directamente sobre los sustratos de silicio poroso debido a que la reactividad de los grupos amino con biomoléculas es mayor sobre estos sustratos que sobre silicio monocristalino, como se ha visto en el apartado 6.3 y en ensayos previos realizados con ADN. La funcionalización se ha llevado a cabo mediante inmersión en disoluciones de APTS y tolueno (a temperatura ambiente durante 30 minutos) y mediante TACVD (en CE durante 15 minutos). La primera hebra de ADN, “ADN problema”, se fija a la superficie activando la reacción mediante luz ultravioleta, empleando una concentración inicial de 2 ng/μl (apartado 2.5.3). La detección de la cadena complementaria unida por hibridación y marcada

fluorescentemente, "ADN sonda", se ha realizado con el microscopio de fluorescencia, empleando las siguientes condiciones de medida: objetivo 20X, rango de verde 15-230, tiempo de exposición: 400 ms, obteniendo imágenes con un área de $340 \times 429 \mu\text{m}^2$. La intensidad de fluorescencia (IF) se ha cuantificado a partir de los histogramas de las imágenes resultantes (figura 6.12), empleando el programa ImageJ. Los valores de IF obtenidos como resultado de la cuantificación se muestran en la figura 6.13.

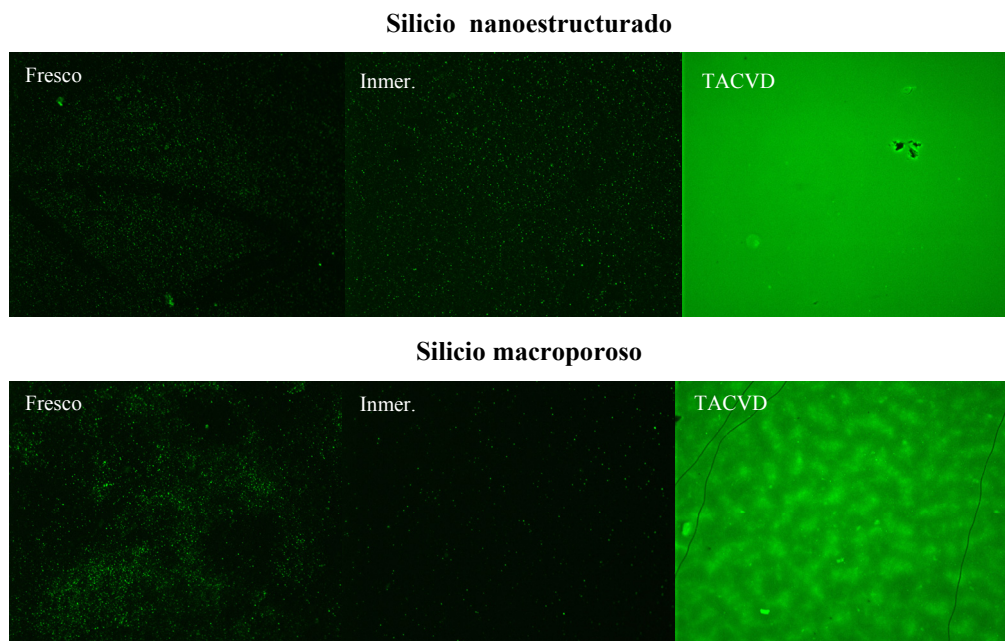


Figura 6.12: Imágenes de fluorescencia correspondientes a sustratos de silicio poroso, antes y después de funcionalizar, sobre los que se ha fijado una cadena de ADN detectada a partir de la hibridación con su cadena complementaria marcada con fluoresceína.

Los sustratos sin funcionalizar y los funcionalizados por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno presentan valores de IF bastante parecidos. No obstante, entre los sustratos sin funcionalizar, el silicio macroporoso presenta un valor más elevado, mientras que tras funcionalizar por inmersión, los sustratos de silicio nanoestructurado dan como resultado una mayor intensidad de fluorescencia debido a que el proceso de inmersión es más eficaz sobre éstos que sobre los de silicio macroporoso. Los sustratos funcionalizados por TACVD presentan los valores de intensidad de fluorescencia más elevados (en concreto seis veces mayor que el siguiente mejor) con independencia del tipo de silicio poroso empleado. Esto demuestra la elevada concentración de grupos amino funcionales que presentan las películas obtenidas por TACVD. Entre los dos tipos de silicio poroso funcionalizados por

TACVD, la intensidad de fluorescencia asociada a silicio macroporoso es 1.4 veces mayor que la asociada al nanoestructurado, por lo que se ha escogido el primero para realizar estudios que permitan establecer el límite de detección por fluorescencia, es decir, la cantidad mínima de ADN inmovilizado sobre la superficie que puede ser detectado. Un límite de detección lo más bajo posible es de gran interés para el desarrollo de un biosensor.

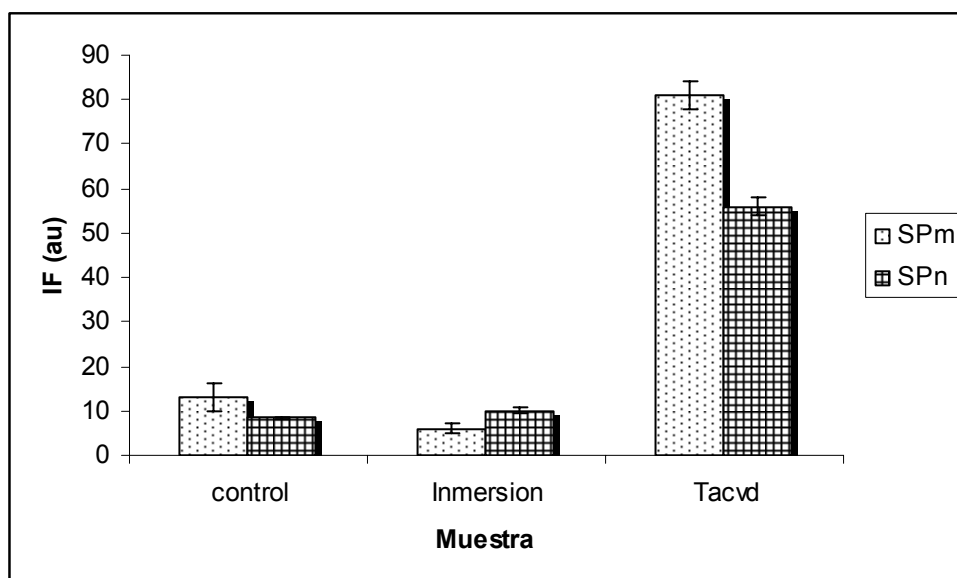


Figura 6.13: Cuantificación de fluoresceína obtenida tras fijar ADN en los distintos sustratos de silicio poroso, antes y después de ser funcionalizados.

Para hallar el límite de detección por fluorescencia se ha asumido que la eficiencia del proceso de hibridación es siempre la misma con independencia de la concentración de ADN problema fijado sobre la superficie, de manera que el límite de detección viene dado por la cantidad mínima de ADN problema que se puede fijar y que da lugar a la detección del ADN sonda hibridado. Para establecer dicho límite de la forma más precisa posible, se han empleado diversas muestras control que permiten cuantificar la fluorescencia asociada a interacciones diferentes a la fijación por enlace covalente entre el ADN y los grupos amino de la superficie y a la hibridación de las dos cadenas complementarias de ADN. Dichas muestras control son las siguientes:

- Control 1: SP_M funcionalizado por TACVD, sin inmovilización de ADN problema pero incubado con el ADN sonda y sometido al proceso de inmunotinción. Esta muestra control permite cuantificar la fluorescencia asociada a adsorciones inespecíficas del ADN sonda con la superficie.

- Control 2: SP_M funcionalizado por TACVD, sin inmovilización de “ADN problema” ni hibridación del ADN sonda y sometido al proceso de inmunotinción. Esta muestra control permite cuantificar la fluorescencia asociada a las adsorciones inespecíficas de los anticuerpos con la superficie.

- Control 3: SP_M funcionalizado por TACVD, con inmovilización de ADN problema e hibridación del ADN sonda pero sin ser sometido al proceso de inmunotinción. Este último control permite evaluar la autofluorescencia del material.

Los sustratos de silicio macroporoso funcionalizados por TACVD se incubaron con las siguientes diluciones de ADN problema: 2ng/μl, 0.2 ng/μ, 0.002 ng/μ y 0.0002 ng/μ. Los resultados de la cuantificación de fluorescencia obtenidos en este caso se muestran en la figura 6.14:

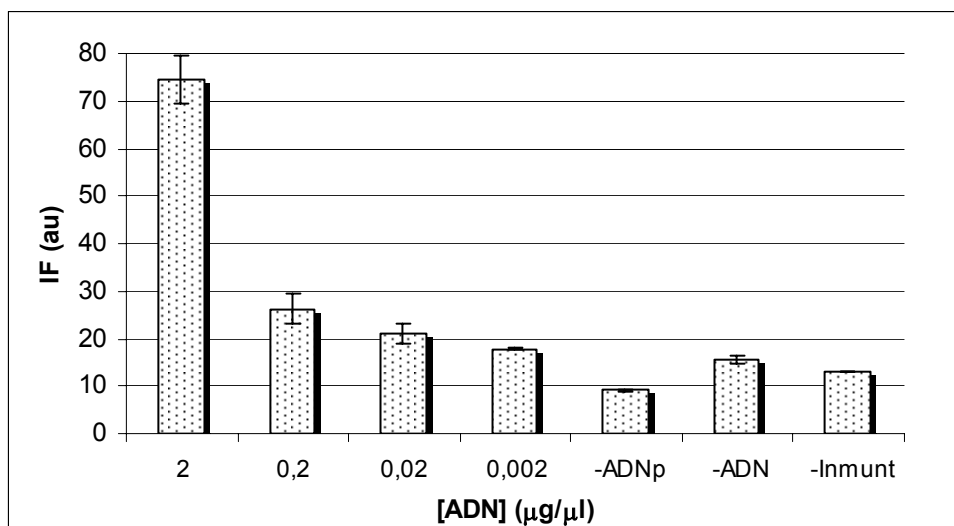


Figura 6.14: Valores de intensidad de fluorescencia obtenidos para las diferentes diluciones de ADN problema encontradas.

Como cabía esperar, los valores de IF disminuyen al disminuir la concentración de ADN problema. La tasa de disminución se puede ajustar a la recta dada por la siguiente expresión: $IF = 27.7 [ADN] + 19.2$ (figura 6.15). A partir del ajuste anterior, se observa que el valor de IF que correspondería a $[ADN] = 0$, es del orden del obtenido en el caso de los controles y de la muestra asociada a la menor concentración de ADN: $[ADN] = 2\text{pg}/\mu\text{l}$. Estableciendo que el límite de detección por fluorescencia corresponde a la concentración mínima que da una señal un 25% superior a la de los controles, se obtiene un límite de detección por fluorescencia correspondiente a una concentración de ADN de $0.02\text{ ng}/\mu\text{l} = 20\text{ pg}/\mu\text{l}$.

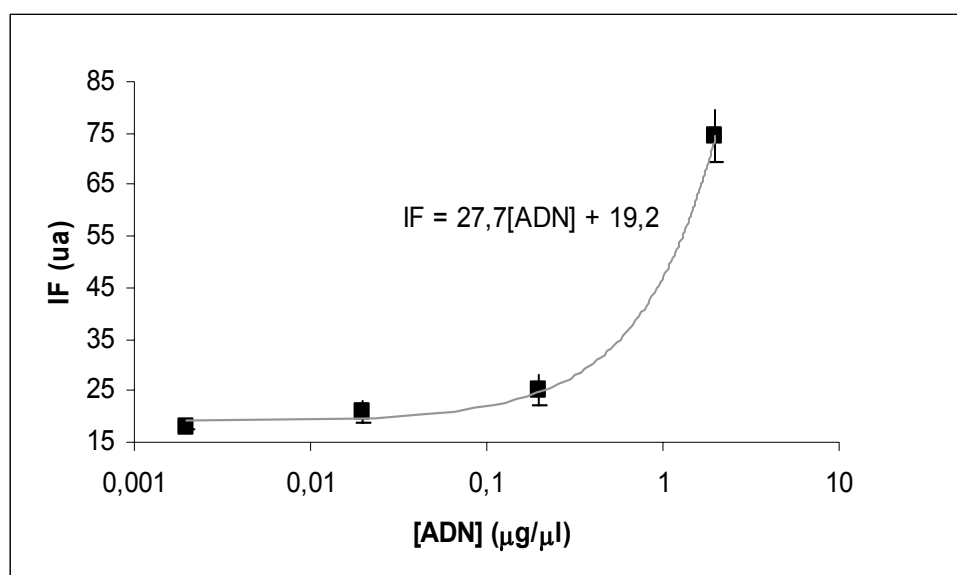


Figura 6.15: Ajuste de la disminución de IF al disminuir [ADN]. Representación logarítmica.

Por lo tanto, los sustratos de silicio poroso funcionalizados por TACVD permiten inmovilizar con gran eficiencia diversas concentraciones de ADN, detectables mediante fluorescencia. Dentro de los sustratos anteriores, los que presentan una mayor eficiencia son los de silicio macroporoso, que permiten obtener un límite de detección por fluorescencia de 20pg/μl. Es interesante destacar, que el límite de detección por fluorescencia es considerablemente menor que por radiactividad, por lo que cambiando el sistema de detección se podría mejorar el límite de detección de ADN.

6.5. Respuesta celular a las superficies.

El siguiente ensayo realizado ha consistido en evaluar las propiedades de los materiales al interactuar con células mesenquimáticas, es decir, células pluripotenciales que pueden diferenciarse a condrocitos, osteocitos y adipocitos. Estas células se caracterizan por crecer cuando se introducen en un medio de cultivo que contiene suero fetal bovino, que se denomina por lo tanto medio de crecimiento (C), mientras que comienzan a diferenciarse al cultivarse en un medio sin dicho suero fetal, denominado medio de diferenciación (D) (apartado 2.5.4). Tanto la fase de crecimiento como la de diferenciación llevan asociadas una determinada disposición de las proteínas

del citoesqueleto. A partir del estudio de la estructura que presentan dichas proteínas y del número de células adheridas a las superficies, así como de su actividad proliferadora en el caso de células cultivadas en medios de crecimiento, se puede evaluar la influencia que los sustratos tienen en la respuesta celular. Para ello se realiza la inmunotinción de las proteínas del citoesqueleto, es decir, se emplean anticuerpos de reconocimiento específico de las proteínas marcados con fluoróforos, lo que permite su detección por microscopía de fluorescencia.

En primer lugar se ha estudiado la influencia que la morfología del sustrato tiene en la respuesta celular, empleando sustratos de silicio nanoestructurado y macroporoso sin funcionalizar. Las imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia, empleando el objetivo 20X ($340 \times 429 \mu\text{m}^2$), se muestran en la figura 6.16. Las imágenes muestran una elevada adherencia de las células sobre los dos tipos de sustratos y con independencia del medio de cultivo empleado. En las imágenes correspondientes a células cultivadas en un medio de diferenciación (D) se observa la formación de agrupaciones esféricas de células, tanto en silicio nanoestructurado como sobre silicio macroporoso. Estas agrupaciones celulares sugieren que se ha producido la migración de las células sobre la superficie del sustrato, como consecuencia de la generación de factores tróficos. No obstante, aunque en ambos tipos de silicio poroso se observa la asociación de células, el tamaño de las agrupaciones así como el de las células que las constituyen es significativamente menor sobre los sustratos de silicio nanoestructurado que en el caso de los sustratos de silicio macroporoso. Por otro lado, las imágenes correspondientes a células cultivadas en un medio de crecimiento (C) presentan una morfología fibroblástica, esto es, células alargadas con el núcleo en posición central, que es la morfología característica de las células en proceso de crecimiento. Como en el caso del medio de diferenciación, el número de células adheridas a la superficie es menor sobre los sustratos de silicio nanoestructurado. Estas diferencias encontradas entre los sustratos de silicio nanoestructurado y macroporoso pueden explicarse en términos del tamaño de los poros. Las células tienen un tamaño de entre 10 y 20 micras cuando están extendidas, por lo que el silicio macroporoso con poros del tamaño de una micra permite mantener la dinámica de fluidos más adecuada para las células, lo que favorece su proliferación.

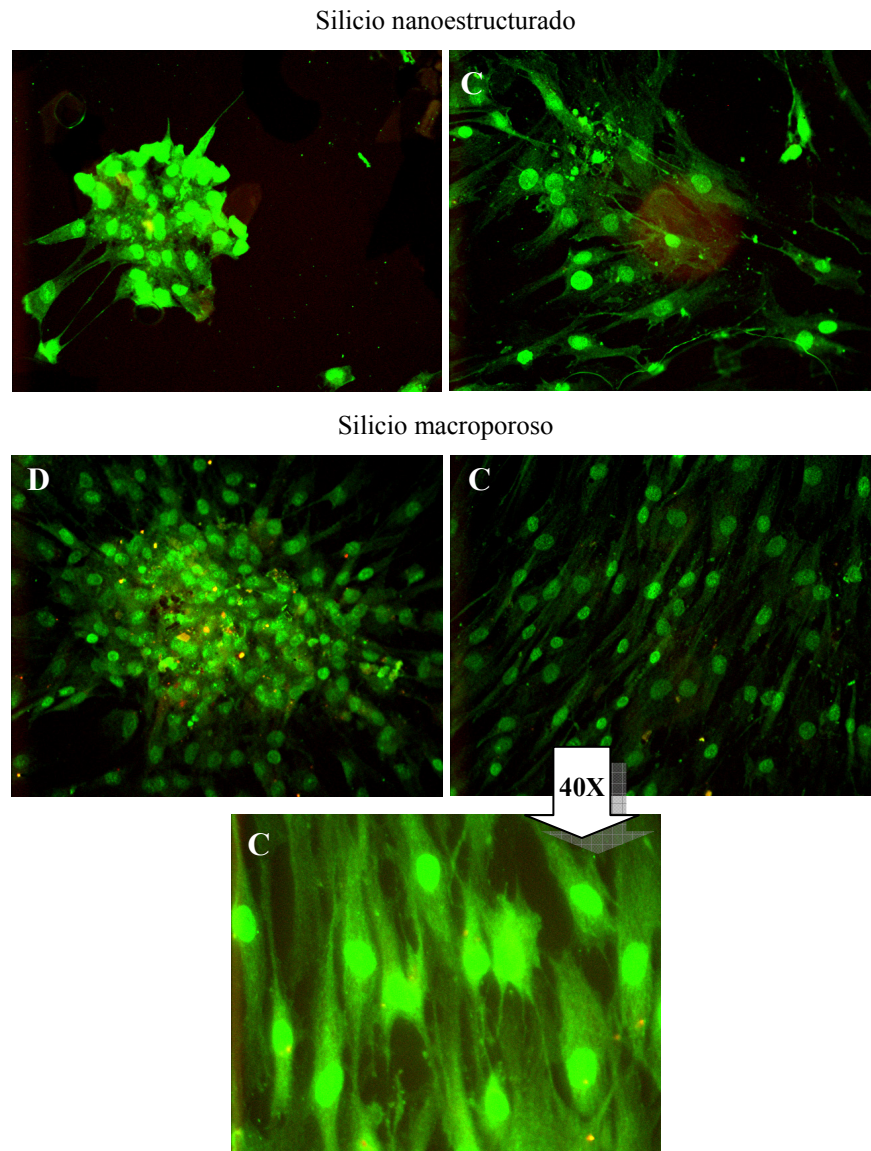
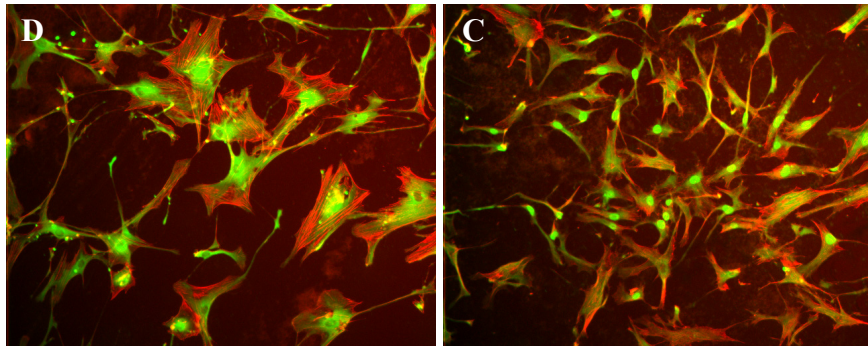


Figura 6.16: Imágenes de fluorescencia correspondientes a células mesenquimáticas cultivadas en medio de diferenciación (D) y de crecimiento (C) sobre superficies de silicio nanoestructurado y silicio macroporoso.

En segundo término se ha estudiado la influencia que la funcionalización tiene en la respuesta de las células (figura 6.17). Para ello, se han empleado sustratos de silicio monocristalino y de silicio nanoestructurado funcionalizados por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno (20 minutos a temperatura ambiente). Como en los sustratos de silicio poroso sin funcionalizar, se observa un elevado número de células sobre la superficie, lo que pone de manifiesto la no toxicidad de las superficies funcionalizadas. Las células obtenidas en medio de crecimiento (C) presentan una morfología fibroblástica sobre los sustratos de silicio nanoestructurado funcionalizados, al igual que se vio en los sustratos de silicio poroso sin funcionalizar (figura 6.16),

mientras que las células crecidas sobre silicio monocristalino presentan una disparidad de morfologías. En cuanto a las células cultivadas en medio de diferenciación (D) se observa que el citoesqueleto se extiende con largas ramificaciones de fibras de actina, morfología característica de las células en proliferación y en un estadio de diferenciación no terminal. Sin embargo, mientras que sobre silicio monocristalino las células tienen una forma más redondeada, sobre silicio nanoestructurado son mucho más alargadas.

Silicio monocristalino funcionalizado por inmersión



Silicio nanoestructurado funcionalizado por inmersión

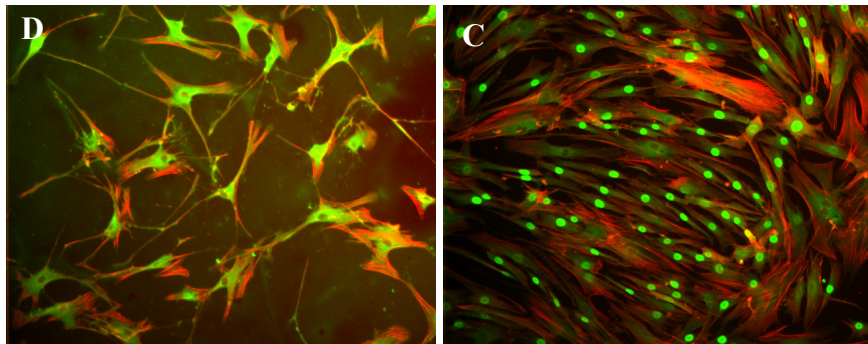


Figura 6.17: Crecimiento de células mesenquimáticas cultivadas en medio de diferenciación (D) y de crecimiento (C) sobre sustratos de silicio monocristalino y silicio nanoestructurado funcionalizados por inmersión.

En resumen, el estudio de la respuesta celular a las superficies de silicio nanoestructurado y macroporoso demuestra que estos materiales no presentan toxicidad al obtenerse sobre la superficie células adheridas, tanto en fase de crecimiento como de diferenciación. Las diferencias encontradas entre los dos tipos de sustratos de silicio poroso ponen de manifiesto la importancia de la morfología de la superficie, siendo la de silicio macroporoso la que induce una mayor proliferación de las células, debido a que el tamaño de sus poros permite una dinámica de fluidos más adecuada que la resultante sobre silicio nanoestructurado.

6.6. Crecimiento de hongos.

El último ensayo biológico se ha realizado empleando hongos *Aspergillus*. Estos hongos están constituidos por cadenas fibrosas formadas por hifas plurinucleadas, que constituyen el micelio. Este género está constituido por cerca de 900 hongos y fue descrito por primera vez en 1729 por P.A. Machali. Son hongos aerobios, que se han encontrado en casi todos los medios ricos en oxígeno, y crecen preferentemente en medios que contienen carbono y, en su defecto, nitrógeno. Se trata de hongos oportunistas, es decir, que producen infecciones en pacientes con sistemas inmunológicos deprimidos. De los 18 grupos en que pueden ser clasificados de acuerdo a su morfología, 12 resultan patógenos para el ser humano [17, 18], especialmente por el reducido tamaño de sus conidias, que hace que sean fácilmente aspirables. Además, tienen gran capacidad de crecer a 37°C y de adherirse a superficies epiteliales y producen un elevado número de productos extracelulares tóxicos para las células de los mamíferos, como la elastasa o la fumigatoxina.

El estudio del crecimiento de hongos *Aspergillus* sobre sustratos de silicio nanoestructurado y macroporoso permite evaluar el comportamiento de las superficies respecto al crecimiento de organismos pluricelulares, completando el estudio de la interacción de los sustratos, antes y después de ser funcionalizados, con sistemas biológicos de complejidad creciente. Además, puesto que los hongos *Aspergillus* corresponden a una de las formas más comunes de contaminación en cultivos celulares y ambientes biomédicos, su crecimiento sobre las distintas superficies permite evaluar la esterilidad de las mismas frente al desarrollo de este tipo de organismos patógenos.

Para comenzar el estudio, se ha evaluado el crecimiento de los hongos sobre superficies de silicio nanoestructurado y silicio macroporoso sin funcionalizar. En ambos casos, el crecimiento de los hongos es prácticamente inexistente, con independencia del tamaño de poro del sustrato. Las diferencias observadas se relacionan con la disposición de las hifas. Así los hongos se disponen agrupando sus hifas en pequeñas zonas de la superficie sobre los sustratos de silicio nanoestructurado, y dejando libre la mayor parte de la misma (figura 6.18, A). Es interesante destacar que los hongos no son capaces de atravesar la interfase Si/SP_n (figura 6.18, B).

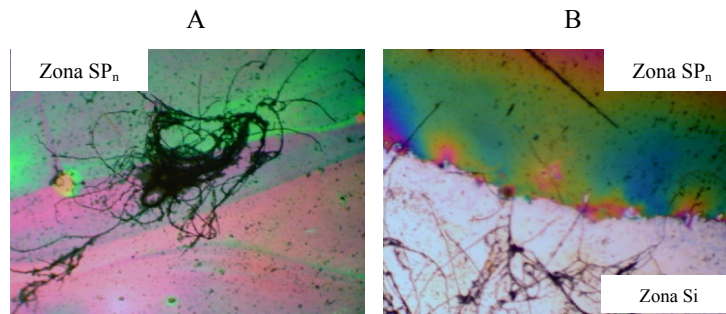


Figura 6.18: Imágenes de microscopía óptica de silicio nanoestructurado incubado con hongos. La imagen de la derecha corresponde a la interfase y la imagen de la derecha a la zona del silicio poroso.

Las imágenes obtenidas para los sustratos de silicio macroporoso muestran que los hongos crecen en zonas concretas, formando agrupaciones de hifas unidas entre sí (figura 6.19, A), con la mayor parte de la superficie completamente limpia (figura 6.19, B):

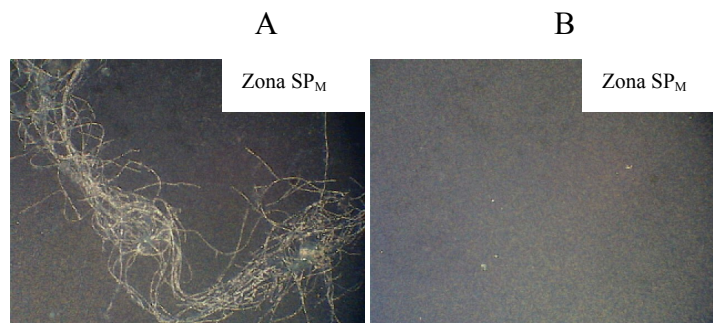


Figura 6.19: Imagen de microscopía óptica de silicio macroporoso incubado con hongos.

Por tanto, los sustratos de silicio poroso sin funcionalizar, muestran un comportamiento similar en cuanto a la proliferación de los hongos, independientemente del tamaño de los poros.

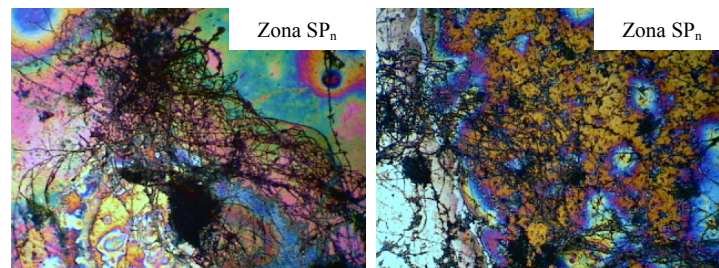


Figura 6.20: Imágenes de microscopía óptica de silicio nanoestructurado funcionalizada por inmersión e incubada con hongos. La imagen de la derecha corresponde a la interfase y la imagen de la derecha a la zona del silicio poroso.

El comportamiento de los distintos sustratos varía tras someterlos a los tratamientos de funcionalización. Así, los sustratos de silicio nanoestructurado (figura

6.20) funcionalizados por inmersión en APTS y tolueno presentan una gran proliferación de hongos, con hifas que atraviesan la interfase Si/SP_n, a diferencia de lo que se observó en los sustratos sin funcionalizar:

Los sustratos de silicio macroporoso funcionalizados por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno muestran una enorme proliferación de hongos (figura 6.21) sobre toda la superficie, tanto en la zona del silicio como en la del SP_M, y a través de la interfase. Además del aumento en la proliferación de los hongos, la morfología del micelio cambia respecto a lo observado en los sustratos antes de funcionalizar. Mientras en los sustratos sin funcionalizar el micelio presentaba un aspecto compacto, en los sustratos funcionalizados por inmersión el micelio es laxo y ramificado, es decir, presenta las características propias de la fase vegetativa.

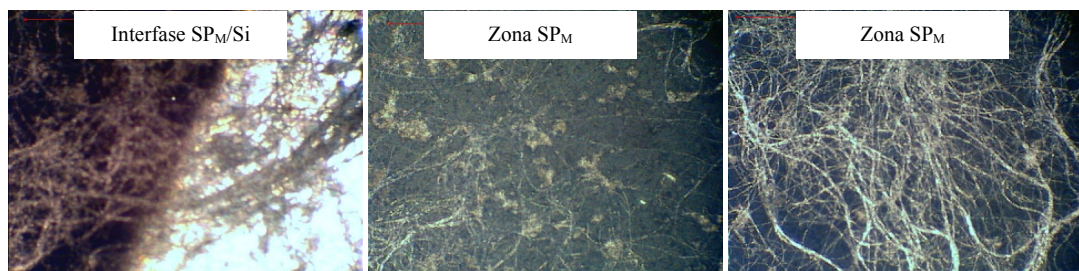


Figura 6.21: Imágenes del crecimiento de hongos sobre la superficie de silicio macroporoso funcionalizado.

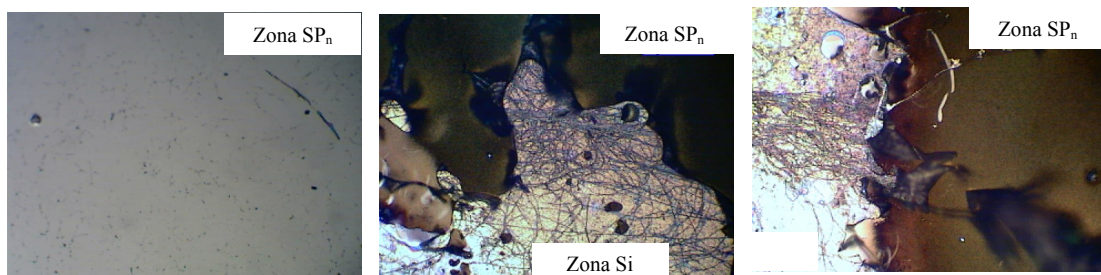


Figura 6.22: Imágenes del crecimiento de hongos sobre muestras de SP_n funcionalizado por TACVD.

El comportamiento de los sustratos de silicio poroso tras ser funcionalizados por TACVD, muestra resultados muy interesantes. Los sustratos de silicio nanoestructurado (figura 6.22) muestran la existencia de hifas en la zona del silicio, mientras que las zonas correspondientes a SP_n cubiertas con la capa biofuncional no presentan crecimiento de hongos. Es decir, los hongos aparecen sobre la zona del silicio pero no en la del SP_n pues la presencia de la capa biofuncional actúa de barrera a los hongos.

De forma análoga, los sustratos de silicio macroporoso funcionalizados por TACVD en condiciones estándar (figura 6.23), muestran la presencia de hifas aisladas en la zona del silicio, mientras que la zona correspondiente al silicio macroporoso aparece completamente limpia. En interesante señalar que el crecimiento de los hongos se ve bloqueado en la interfase SP_M/Si , a diferencia de lo que ocurría en las muestras sin funcionalizar.

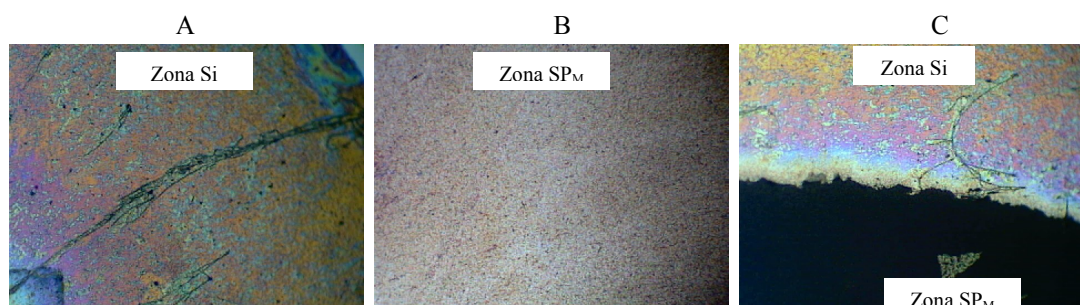


Figura 6.23: Imágenes del crecimiento de hongos sobre muestras de silicio macroporoso funcionalizado por TACVD, correspondientes a: zona del Si, zona del SP e interfase.

Las capas biofuncionales resultantes del proceso de PECVD se levantaron durante el proceso de crecimiento de hongos en todos los casos estudiados, por lo que no se pudo obtener información sobre su comportamiento es presencia de hongos.

Por lo tanto, se puede concluir que el silicio poroso, tanto nanoestructurado como macroporoso, sin funcionalizar no favorece el crecimiento de los hongos. La funcionalización por inmersión hace que crezcan y atraviesen la interfase sin problemas, presentado la morfología característica de la fase vegetativa, mientras que la funcionalización por TACVD impide el crecimiento de los mismos en la zona del SP. Estos resultados muestran que se puede cambiar el comportamiento de un material en función de los requerimientos de la aplicación en que vaya a emplearse. Pero además, en el caso particular de la funcionalización por TACVD, es importante destacar que las películas obtenidas son biofuncionales, con una elevada concentración de grupos amino, bioactivas y que presentan resultados muy positivos en la inmovilización de proteínas y ADN, y que sin embargo impiden el crecimiento de hongos *Aspergillus*, importante fuente de contaminación.

6.7. Sumario

A lo largo de este último capítulo se ha evaluado el comportamiento de los sustratos funcionalizados por las diversas técnicas estudiadas en este trabajo, al interaccionar con sistemas biológicos de distinta complejidad y se han perfilado algunas de las posibles aplicaciones derivadas de dichas interacciones.

La bioactividad de los sustratos, evaluada a partir de la precipitación de fosfato cálcico, muestra que los sustratos que inducen una mayor precipitación son los de silicio nanoestructurado con independencia de que se encuentren o no funcionalizados. Por el contrario, el sustrato que induce una menor precipitación de fosfato cálcico es el silicio macroporoso. La fase en que se producen los precipitados es diferente en función de que los sustratos se encuentren o no funcionalizados. Así, los sustratos funcionalizados presentan como fase mayoritaria la withlockite (Mg-TCP: $\text{Ca}_2\text{Mg}(\text{PO}_4)_2$), mientras que en los sustratos sin funcionalizar la fase es fosfato dicálcico (DCP: CaHPO_4) sobre silicio nanoestructurado e hidroxiapatita (HAp: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) sobre silicio macroporoso.

Respecto a la inmovilización de biomoléculas, los análisis realizados muestran que se han fijado tanto proteínas como ADN sobre las superficies funcionalizadas, en mayor medida en los sustratos funcionalizados por TACVD. En el caso de la inmovilización de proteínas, la variación registrada en los espectros de reflectancia del silicio nanoestructurado, tanto monocapas como multicapas, como consecuencia de dicha inmovilización es significativa, de manera que permite relacionarla con la presencia de proteínas sobre la superficie. En el caso de la fijación de ADN, se ha conseguido un límite de detección por fluorescencia de 20 pg/μl para los sustratos de silicio macroporoso funcionalizados por TACVD.

Los ensayos realizados para evaluar la respuesta de las células muestran que las superficies de los sustratos de silicio nanoestructurado y macroporoso, antes y después de ser funcionalizados, no muestran toxicidad para las células. En función del medio de cultivo empleado, se ha comprobado que las células crecen y se diferencian, con una mayor proliferación en los sustratos de silicio macroporoso debido a las propiedades de vascularidad introducidas por su elevado tamaño de poro.

Por último, los ensayos realizados con hongos *Aspergillus* muestran que éstos proliferan enormemente sobre los sustratos funcionalizados, a excepción de los sustratos

funcionalizados por TACVD. Este comportamiento es de gran relevancia, puesto que el método de TACVD da lugar a la formación de capas con una elevada funcionalidad y eficiencia en la fijación de biomoléculas que además eluden el crecimiento de contaminantes como los hongos *Aspergillus*.

6.8. Bibliografía

1. D.F. Williams, Definitions in biomaterials vol.4, Elsevier, Ámsterdam, 1998.
2. L.L. Hench, Journal of the American Ceramics Society (USA), 74 (1992), 1487
3. T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsigi and T. Yamamuro. Journal of Biomedical Materials Research, 24 (1971), 117-
4. S. Fujibayashi, M. Neo, H.M. Kim, T. Kokubo y T. Nakamura, Biomaterials 24, 8 (2003), 1349-1356.
5. S.B. Cho, K. Nakanishi, T. Kokubo and N. Soga. Journal of American Ceramic Society, 78, 7 (1995), 1769-1774.
6. M. M. Pereira, A.E. Clark y L. L. Hench. Journal of American Ceramic Society, 78, 9 (1995), 2463-2468.
7. M. Tanahashi y T. Matsuda. Journal of Biomedical Materials Research, 34 (1997), 305-315.
8. L.T. Canham, C.L. Reeves, A. Loni, M.R. Houlton, J.P. Newey, A.J. Simons, T.I. Cox. Thin Solid Films, 297 (1997), 304-307.
9. M. Kamitakahara, C. Ohtsuki, Y. Kozaka, S. Ogata, M. Tanihara, T.Miyazaki. Journal of the Ceramic Society of Japan 114 (2006), 1325, 82-86.
10. T.Kosini, T.Yao, M.Tajima, H.Ohshima, H.Ito y T.Hattoyi. Japanese Journal of applied physics, 31 (1992), L1216
11. Antibodies: A Laboratory Manual, E. Harlow and D. Lane. Eds. Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, NY, 1988) pp. 628-629.
12. J. Álvarez, D.C. Lee, S.A.Baldwin, D.Chapman. Journal of Biological Chemistry. 262, (1987) 15, 3502-3509.
13. S.Dong, G.Luo, J.Feng, Q. Li, H.Gao. Electroanalysis 13 (2001) 1, 30-33.
14. V. Torres-Costa, R.J. Martín-Palma, J.M. Martínez-Duart. Applied Physics A, 79 (2004) 8, 1919-1923.

15. M. Archer, P.M. Fauchet. *Physica Status Solidi a*, 198 (2003), 2, 503-507.
16. S. Chan, Y. Li, L.J. Rothberg, B.L. Miller, P.M. Fauchet. *Materials Science and Engineering C* 15 (2001) 277-282.
17. Denning D.W, Stevens D.A. *Rev Infect Dis* 12 (1990), 1147-1201.
18. P.M. Arnow, M. Sadigh, C. Costas, D. Weil, R. Chudy. *Journal of Infectious*

Capítulo 7
Conclusiones.

7.1. Introducción.

A lo largo de este trabajo de Tesis se ha estudiado la biofuncionalización basada en la deposición de grupos amino sobre sustratos de silicio monocristalino, nanoestructurado y macroporoso. El objetivo ha sido desarrollar una técnica que permita la funcionalización de sustratos con composición química variable y morfologías diversas, como es el caso de los sustratos antes mencionados. Para ello, se han desarrollado y estudiado técnicas de funcionalización basadas en la deposición química en fase vapor, empleando distintos métodos de activación del precursor 3-aminopropiltrietoxisilano (APTS). Con el fin de evaluar la eficiencia de estos métodos, se ha tomado como referencia una técnica de uso estándar con APTS, la inmersión en disoluciones de APTS en tolueno, escogida por la rapidez y sencillez con que se realiza y por lo ampliamente documentada que aparece en la bibliografía.

Los sustratos empleados en este trabajo se han escogido debido a las interesantes propiedades que presentan para su uso en aplicaciones derivadas del desarrollo de la Biofísica. Aunque todos ellos son materiales constituidos esencialmente por silicio, sus diferentes morfologías y composiciones químicas superficiales, permiten introducir un amplio rango de variables en el estudio de su interacción directa con diversos sistemas biológicos. Sin embargo, estas diferencias hacen necesario el empleo de una técnica de biofuncionalización que presente gran versatilidad respecto a las propiedades superficiales de los sustratos.

El estudio de las técnicas de biofuncionalización requiere el análisis de las propiedades físico-químicas de las películas resultantes, el análisis de la funcionalidad de los grupos amino superficiales y finalmente la evaluación de la interacción de dichas películas con diversos sistemas biológicos.

7.2. Resumen de resultados.

A partir de obleas de silicio de baja y media resistividad, se han formado capas de silicio nanoestructurado y silicio macroporoso empleando electrolitos de ácido fluorhídrico y etanol y de ácido fluorhídrico y dimetilformamida, respectivamente. Las capas de silicio poroso recién formado están compuestas en su superficie por enlaces

SiH_x esencialmente y, debido a la elevada reactividad superficial que presentan, transcurridos unos segundos se empiezan a incorporar O y C. El silicio nanoestructurado presenta fotoluminiscencia con el máximo de emisión en el rango visible centrado en 652 nm (1.9 eV).

Puesto que el silicio poroso tiene una elevada reactividad superficial, se ha estudiado la influencia de los tratamientos de esterilización en etanol y limpieza en disolución tampon de fosfato necesarios para el empleo de los sustratos de silicio poroso en los ensayos biológicos. La esterilización mediante etanol induce cambios tanto en la composición química como en la fotoluminiscencia que son comparables con los sufridos por sustratos expuestos a la atmósfera o conservados en cámara seca en las primeras 24 horas después de su formación. La limpieza con buffer salino induce una elevada oxidación y la formación de silanoles, responsables en buena medida del desplazamiento de la banda de fotoluminiscencia desde 652 nm (1.9 eV) a 496 nm (2.5 eV). Esta emisión solapa parcialmente con la fluorescencia del isotiocianato de fluoresceína, que es el fluoróforo empleado para evaluar la reactividad de los grupos amino. Para minimizar este efecto, los sustratos deben estabilizarse durante un mínimo de 24 horas desde su fabricación hasta ser expuestos a PBS o bien emplear protocolos para eliminar la fotoluminiscencia de los materiales.

La biofuncionalización por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno da lugar a la formación de láminas delgadas de oligómeros de APTS sobre las que se depositan coloides, como muestran los análisis de superficie realizados por SEM y AFM. Estas estructuras se forman como consecuencia de la hidrólisis y la condensación de las moléculas de APTS en disolución, según se ha comprobado mediante los análisis químicos de FTIR y de XPS. Las medidas de XPS muestran además que se obtiene una elevada concentración de grupos amino en superficie como resultado del proceso de inmersión.

Las dos variables cuya influencia se ha evaluado son el tiempo y la temperatura de la disolución durante el proceso de inmersión. El aumento de la temperatura produce un incremento del número y el tamaño de los coloides depositados. El aumento del tiempo de inmersión se traduce en un menor grado de hidrólisis y polimerización del APTS, lo que da lugar a la formación de estructuras con un menor volumen asociado y con una menor concentración de grupos amino.

Los sustratos empleados en esta técnica, el silicio monocristalino y el silicio nanoestructurado muestran diferencias significativas entre sí tras ser funcionalizados. Las estructuras formadas sobre silicio nanoestructurado recubren la superficie con mayor uniformidad y están compuestas por coloides de mayor tamaño que las obtenidas sobre silicio monocristalino empleando las mismas condiciones de funcionalización. Respecto a las propiedades químicas, se observa que el APTS sufre menor hidrólisis y condensación al funcionalizar sustratos de silicio nanoestructurado que al emplear silicio monocristalino, y que da lugar a una menor concentración de grupos amino, calculada a partir de los espectros de XPS. Por último, las propiedades de funcionalidad evaluadas con isotiocianato de fluoresceína y nitrobenzaldehído muestran una mayor reactividad superficial de los sustratos funcionalizados a temperatura ambiente y en especial de los de silicio monocristalino. Las diferencias observadas entre los resultados obtenidos por XPS y los análisis de reactividad superficial ponen de manifiesto la influencia en la funcionalidad de las películas de otros factores, como la orientación superficial de los grupos, además de la concentración de los mismos. Así, aunque la concentración de grupos amino es menor sobre silicio nanoestructurado, la proporción de los mismos que son funcionales es mayor que en el caso del silicio monocristalino.

A continuación se estudió la biofuncionalización por deposición química en fase vapor, activando el APTS bien por plasma bien por temperatura. En el primer caso, se obtuvieron películas biofuncionales, con una elevada concentración en nitrógeno superficial, pero que presentan bajas propiedades de adherencia a los sustratos de silicio monocristalino, al someterlas a ensayos biológicos.

Mediante el método de biofuncionalización por deposición química en fase vapor, con activación térmica del APTS, se han obtenido películas con una elevada funcionalidad sobre sustratos tan diversos como el silicio monocristalino, el silicio nanoestructurado, el silicio macroporoso o el oro. Los análisis realizados han demostrado que el mecanismo de deposición tiene lugar como consecuencia de los siguientes procesos: la descomposición de las moléculas de APTS producida por la activación térmica, el calentamiento de los sustratos por efecto del flujo de APTS y argón incidente y la difusión superficial de las especies químicas resultantes de la descomposición del APTS. Se ha observado la existencia de una temperatura mínima de activación del APTS. Por debajo de dicha temperatura, la tasa de deposición es

prácticamente nula, la composición química de las películas resultantes coincide básicamente con la de las moléculas de APTS y la funcionalidad asociada es casi inexistente. Los mecanismos de calentamiento del sustrato y de difusión de las especies químicas a través de la superficie conllevan cierta dependencia con el tipo de sustrato, de manera que los parámetros de deposición que dan lugar a la formación de películas con las propiedades óptimas de funcionalidad sobre los distintos sustratos son diferentes en cada caso. Por ejemplo, los parámetros que dan lugar a condiciones óptimas de funcionalidad de las películas son $T_{\text{evap}} = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{act}} = 750\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P_{\text{Ar}} = 1\text{ mbar}$ en el caso del silicio monocristalino, y $T_{\text{evap}} = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{act}} = 750\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P_{\text{Ar}} = 0.4\text{ mbar}$ en el caso del silicio nanoestructurado. La temperatura mínima de activación también difiere para los distintos sustratos de manera que es de $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ para los sustratos de silicio monocristalino mientras que para los de silicio nanoestructurado es de $750\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se ha comprobado que el diseño del reactor permite mantener la temperatura de los sustratos por debajo de los $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en todos los casos estudiados.

Las películas obtenidas mediante TACVD son homogéneas, con espesor uniforme. En el caso de los sustratos de silicio monocristalino, se ha comprobado que las propiedades de microdureza de las películas biofuncionales coinciden prácticamente con las del sustrato de partida, con la única excepción de las películas obtenidas empleando parámetros de deposición que dan lugar a la formación de estrías y laberintos sobre la superficie. Los parámetros que dan lugar a la formación de estas estructuras están relacionados con un aumento y un cambio en el régimen del flujo de precursor.

Respecto a la funcionalidad, las películas depositadas mediante TACVD presentan una elevada concentración de grupos amino, tanto en superficie como en un cierto espesor, como demuestran los análisis de XPS realizados con bombardeo superficial mediante iones de argón. Por su parte, los ensayos de reactividad superficial realizados con isotiocianato de fluoresceína y nitrobenzaldehído muestran que las películas tienen una elevada concentración de grupos amino funcionales, aproximadamente el triple que los obtenidos mediante el proceso de inmersión en disoluciones de APTS y tolueno. Además, las películas depositadas sobre silicio monocristalino se comportan como membranas permeables a moléculas del tamaño del nitrobenzaldehído (2.4 \AA)

Los ensayos de bioactividad de los sustratos sin funcionalizar muestran que sólo el silicio nanoestructurado induce la precipitación de fosfato cálcico. Sin embargo, tras ser funcionalizados, todos los sustratos inducen nucleación de fosfato cálcico, con una mayor tasa de precipitación sobre las películas obtenidas por TACVD.

La interacción de las películas con proteínas y ADN da lugar a una elevada fluorescencia, lo que demuestra la inmovilización y la funcionalidad biológica de dichas biomoléculas sobre las superficies de los sustratos. Mientras que los resultados obtenidos para los sustratos funcionalizados por inmersión son comparables a los obtenidos en los sustratos correspondientes sin funcionalizar, los resultados obtenidos mediante TACVD muestran una inmovilización de proteínas unas cuatro veces superior a la observada en los sustratos y unas siete veces superior en el caso de ADN. Los límites de detección más bajos se han encontrado para moléculas de ADN inmovilizadas sobre sustratos de silicio macroporoso funcionalizados por TACVD.

El estudio de la respuesta celular a las superficies ha demostrado la proliferación de células sobre sustratos de silicio nanoestructurado y macroporoso, tanto antes como después de ser funcionalizados. En particular, la vascularización obtenida a través de los poros que constituyen el silicio macroporoso estimula el crecimiento de las células con morfología fibroblástica en el caso de emplear medios de crecimiento y favorece la formación de agrupaciones celulares en el caso de emplear medios de diferenciación.

Por último, los sustratos de silicio nanoestructurado y macroporoso impiden el crecimiento y desarrollo de hongos *Aspergillus*, una de las formas más comunes de contaminación en ambientes biomédicos. Este comportamiento se ve incluso reforzado tras la funcionalización por TACVD. Por el contrario, la funcionalización por inmersión en disoluciones de APTS y tolueno favorece la proliferación de estos organismos patógenos.

7.3 Conclusiones:

Como resultado de este trabajo de Tesis se pueden destacar las siguientes conclusiones y objetivos conseguidos a partir del desarrollo de la técnica de TACVD para la biofuncionalización de los diversos sustratos:

√ Se han depositado películas funcionales con una elevada reactividad superficial sobre sustratos con propiedades morfológicas y composición química superficial tan diferentes como el silicio monocristalino, el silicio nanoestructurado, el silicio macroporoso o el oro. El grado de funcionalización es significativamente más elevado que el obtenido por la técnica de inmersión en disoluciones de APTS en tolueno.

√ Las películas depositadas no sólo tienen una elevada concentración de grupos amino en superficie sino también en profundidad.

√ Las películas funcionales son planas y de espesor uniforme en todos los sustratos estudiados, con excepción de las películas depositadas en condiciones de elevado flujo de precursor.

√ Las películas obtenidas sobre sustratos de silicio monocristalino tienen prácticamente las mismas propiedades de microdureza que el silicio, a excepción de las películas con estructura superficial de laberintos y estrías.

√ Las películas biofuncionales obtenidas por TACVD tienen una elevada bioactividad. Los sustratos que presentan bioactividad, como el silicio nanoestructurado, la mejoran significativamente. Los sustratos que presentan bioactividad nula (silicio monocristalino y macroporoso) dan resultados positivos tras la funcionalización por TACVD.

√ Se han inmovilizado anticuerpos y ADN sobre las superficies de los sustratos funcionalizados, consiguiendo el límite de detección más bajo en los sustratos funcionlizados por TACVD. En el caso particular de los sustratos de silicio macroporoso funcionalizados por TACVD, el límite de detección por fluorescencia para ADN es de 20 pg/ μ l.

√ La respuesta celular a las superficies de los sustratos muestra que las propiedades de vascularización introducidas por los sustratos de silicio macroporoso favorecen el crecimiento de las células y la formación de agrupaciones celulares que se relacionan con la migración celular.

√ Las películas obtenidas por TACVD sobre silicio nanoestructurado y macroporoso inhiben el crecimiento y la proliferación de hongos *Aspergillus* sobre la superficie.

7.3. Líneas futuras de investigación

El desarrollo de este trabajo de Tesis ha dejado abiertas una serie de líneas de investigación relacionadas tanto con la optimización de algunos de los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo como con diversas aplicaciones derivadas de ellos.

El estudio sistemático de la influencia de los parámetros que controlan el proceso de funcionalización mediante TACVD ha permitido alcanzar un gran control sobre los mecanismos responsables del proceso. Entre las aplicaciones que pueden derivarse de este trabajo cabe destacar el desarrollo de biosensores de silicio poroso basados en la variación de sus propiedades ópticas. Los biosensores basados en la variación de la reflectancia de estructuras de silicio poroso, como refractores de Bragg o cristales fotónicos, cuyas propiedades ópticas se conocen con precisión, requieren como punto de partida la caracterización y control de las propiedades ópticas de las propias películas biofuncionales. Los biosensores basados en la fotoluminiscencia en el visible no han podido ser investigados suficientemente debido a la inestabilidad que presenta esta propiedad. Sin embargo, la aparición de una nueva banda, como consecuencia de los procesos asociados a los ensayos biológicos, lleva a plantearse un estudio más detallado del comportamiento de la fotoluminiscencia en el rango verde-azul.

La bondad que las superficies de silicio poroso, especialmente el silicio nanoestructurado, presentan en la interacción con células pluripotenciales, permitiendo el crecimiento, la diferenciación y la migración de las mismas a lo largo de la superficie, abren excelentes perspectivas para el empleo de este material en el desarrollo de tejidos biológicos sobre su superficie.

Por último, un aspecto del silicio macroporoso que no se ha abordado en este trabajo es su comportamiento reabsorbible en contacto con diversos sistemas biológicos. Este hecho combinado con los excelentes resultados obtenidos al estudiar su interacción con sistemas biológicos llevan a proponer su estudio como sustrato vehículo en la aplicación localizada de fármacos en el cuerpo humano.